HAL
open science

Régulation de l'activité autophagique par les récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G : rôle essentiel dans la migration directionnelle

Pierre-Michaël Coly

To cite this version:

Pierre-Michaël Coly. Régulation de l'activité autophagique par les récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G : rôle essentiel dans la migration directionnelle. Cancer. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR004 . tel-01519910

HAL Id: tel-01519910

https://theses.hal.science/tel-01519910

Submitted on 9 May 2017

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Inhibition de l'activité autophagique par les récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G : rôle essentiel dans la migration cellulaire

Présentée et soutenue par
Pierre-Michaël Coly

Thèse soutenue publiquement le 2 février 2017 devant le jury composé de		
M Régis Delage-Mourroux	Professeur des Universités, Université de Franche-Comté	Rapporteur
M Philippe Deterre	Directeur de Recherche, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mme Carole Brasse-Lagnel	MCU-PH, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mme Julie Pannequin	Chargée de Recherche, Université de Montpellier	Examinateur
M Pierrick Gandolfo	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Co-Directeur de thèse
M Fabrice Morin	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie	Co-Directeur de thèse

Laboratoire DC2N

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

EdNBISE Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

DC2N

Le Professeur Régis Delage-Mourroux, Professeur à l'Université de Franche-Comté, a volontiers accepté de siéger dans ce jury de thèse en qualité de rapporteur. C'est pour moi un privilège que les travaux présentés dans ce manuscrit soient jugés par un spécialiste de la machinerie autophagique. Je l'en remercie très sincèrement.

Le Docteur Philipe Deterre, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Pierre et Marie Curie, a également accepté d'être le rapporteur de ce travail, en tant qu'expert des RCPG chimiotactiques et de leurs voies de transduction. Je tiens à le remercier de me faire cet honneur.

Le Docteur Carole Brasse-Lagnel, Praticienne Hospitalière et Maître de Conférences à l'Université de Rouen Normandie, a bien voulu, en tant qu'examinatrice de ce travail, apporter son regard d'experte dans le processus autophagique. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance.

Le Docteur Julie Pannequin, Chargée de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier, me fait également l'honneur d'être examinatrice dans ce jury. Je tiens à sincèrement la remercier de partager son expertise sur les mécanismes cellulaires de l'invasion tumorale, et pour l'évaluation de ce travail.

Au Professeur Pierrick Gandolfo, Professeur à l'Université de Rouen Normandie, je tiens tout d'abord à le remercier pour ses enseignements, dont j'ai eu la chance de bénéficier tout au long de mon cursus universitaire. C'est grâce à lui que je me suis découvert la passion pour la recherche et les neurosciences, qui m'ont amené à réaliser des stages en laboratoire. Je le remercie également pour les précieux conseils qu'il m'a apportés durant ces années, et pour sa bonne humeur au quotidien.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Fabrice Morin, Maître de Conférence à l'Université de Rouen Normandie, et mon mentor depuis maintenant 5 ans. Je le remercie de m'avoir accueilli dès ma première année de Master, et de m'avoir accordé sa confiance. Il a été pour moi, un véritable modèle de rigueur et de qualités scientifiques, que j'espère un jour pourvoir égaler. Toutes ces années, pendant lesquelles nous avons mené ce projet, préparé des présentations, rédigé des documents, m'ont permis d'évoluer et d'acquérir des compétences qui me serviront à la fois sur le plan scientifique et sur le plan personnel. Malgré un emploi du temps parfois très chargé, je le remercie chaleureusement d'avoir sacrifié son temps (et surement un peu de sommeil) durant les périodes de rédaction. Enfin, je le remercie d'avoir toujours été présent, disponible et souriant.

Je remercie le Docteur Youssef Anouar, Directeur de Recherche Inserm, et du laboratoire Inserm U982 de Différenciation et Communication Neuronale

et Neuroendocrine, qui m'a accueilli au sein de son unité durant toutes ces années.

Au Docteur Hélène Castel, Directrice de Recherche Inserm, je lui suis sincèrement reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de son équipe, dans laquelle j'ai pu m'épanouir et faire mes armes dans le milieu de la recherche. Je la remercie d'avoir partagé avec moi, ses inestimables connaissances scientifiques, et d'avoir toujours tout fait pour subvenir aux besoins de l'équipe. Enfin je la remercie d'avoir été un modèle de persévérance durant toutes ces années. Comme elle me l'as si bien dit lors de notre première rencontre, « avec le travail, on peut déplacer des montagnes ».

Docteur Marie-Christine Tonon, Directrice de Recherche Inserm, je tiens à la remercier pour ses conseils et son aide. Son œil de lynx a été d'une aide précieuse pendant les relectures de ce manuscrit. Je la remercie également pour ta gaité à toutes épreuves, et bien entendu, un grand merci pour les petites friandises ramenées de Tunisie.

Docteur Laurence Desrues, grande gardienne du savoir, sans qui l'équipe ne serait certainement pas ce qu'elle est aujourd'hui. Je tiens à la remercier, d'abord pour son aide et ses conseils avisés en biologie moléculaire, mais surtout pour sa disponibilité et sa bonne humeur. Ce fut un réel plaisir de réaliser cette thèse en sa présence. Qu'elle trouve ici ma sincère gratitude.

Je souhaite remercier le Docteur Martine Dubois pour son soutien, ainsi que ses précieux conseils. Je tiens également à remercier Catherine Beau pour sa gentillesse et sa disponibilité. Elle m'a souvent été d'un grand secours.

Je dédie ce passage aux Pingouins ; il n'y a pas de meilleur terme pour décrire l'esprit d'entraide et de solidarité qui règne entre les « jeunes » de l'équipe 3. Jane (véritable iPod sur patte), Benji (encore à « Becquerel » ?), Alex (notre Tony Stark à nous, insérer sifflement Herta ici), Paulo (finalement je n'aurais pas réussi à te faire passer chez Google), Mélanie (bon quand est-ce que tu reviens ?), Cynthia (grande défenseuse des animaux), Auriane (Pingouins par adoption, et protectrice de ma santé physique et mentale) et tous les Pingouins d'hier, je voudrais vous remercier car sans vous, cette expérience n'aurait pas été la même. Que ce soit pendant le rush des grosses manips, ou lors les sessions de debriefing au 3P, nous avons tissé des liens qui, je sais, perdureront.

Ces quelques mots sont adressés à mes « aînés » Rhita et Matthieu, à Alexis mon frère de thèse, ainsi qu'à tous les doctorants de l'U982. On dit qu'il n'y a que dans une salle de manip qu'un doctorant peut croiser quelqu'un qui puisse réellement le comprendre. En ce sens, j'ai eu la chance de trouver les salles d'Histo, BM2 et L2 toujours bien remplies de gens formidables. Ce sentiment de ne jamais vraiment être seul face à un problème n'a pas de

prix, et votre présence à mes côtés a été une réelle source de motivation et de sérénité. Pour cela, je souhaite vous remercier du fond du cœur. Toujours ensembles dans les bons comme les mauvais moments, j'espère que la solidarité qui nous caractérise perdurera. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

Charlotte, je tiens à te remercier du fond de mon cœur. C'est en me voyant compter des autophagosomes tous les weekends que tu as compris dans quoi tu t'étais lancée (à vrai dire…c'est à ce moment-là que j'ai compris aussi). Eh oui, être la compagne d'un doctorant veut souvent dire devoir le partager avec sa thèse. Malgré cela, tu m'as toujours offert de l'amour, et un soutien sans faille, et sans lesquels je n'y serais jamais arrivé.

Un grand merci à ma famille, qui m'a soutenue toutes ces années et a toujours fait en sorte que je ne manque de rien. Malgré la distance, notre complicité reste inébranlable. Papa, maman, Paty, Christian, Rosy, et Antie, j'espère vous avoir rendu fiers. Enfin, à mes amis que j'ai un peu négligés ces dernières semaines (voire mois). Ange, Dy, Léa, Toky, Sylvain, Ilyes, je vous remercie très sincèrement pour votre compréhension. Quelques lignes ne suffisent pas pour exprimer à quel point je suis reconnaissant de vous avoir rencontré, mais bien heureusement, il nous reste toute une vie pour que je vous le montre.

Sommaire

SOMMAIRE **1**

CURRICULUM VITAE **3**

RESUME **6**

ABSTRACT **9**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

CHAPITRE I : LA MIGRATION DIRECTIONNELLE **15**

1. LA POLARISATION 16
2. LA DYNAMIQUE DE L'ACTINE 18
   2.1. Le lamellipode *18*
   2.2. Le filopode *21*
3. LES ADHESIONS 22
   3.1. La composition de la matrice extracellulaire *23*
   3.2. Les différents types d'adhésions *24*
   3.3. L'assemblage des complexes d'adhésion *26*
   3.4. Le désassemblage des complexes d'adhésion *30*
   3.5. L'endocytose des intégrines *32*
   3.6. Le recyclage des intégrines *34*
4. CONTROLE DE LA MIGRATION PAR DES RCPG CHIMIOTACTIQUES 36
   4.1 Les récepteurs aux chimiokines *37*
   4.2. Les récepteurs aux peptides vasoactifs *39*
   4.3. Lipides bioactifs *40*
5. ROLE DES RCPG CHIMIOTACTIQUES DANS L'INVASION TUMORALE 41

CHAPITRE II : L'AUTOPHAGIE **43**

1. HISTORIQUE 43
2. LES DIFFERENTES FORMES D'AUTOPHAGIE 44
   2.1. La micro-autophagie *44*
   2.2. L'autophagie médiée par les chaperonnes *45*
   2.3. La macro-autophagie *47*
3. LA MACHINERIE AUTOPHAGIQUE 47
   3.1. Initiation de l'autophagie *48*
   3.2. La nucléation et l'élongation du phagophore *52*
   3.3. Elongation du phagophore : les différentes sources de membranes *55*
   3.4. Maturation des autophagosomes et fusion avec les lysosomes *59*
4. MODES DE REGULATION DE L'AUTOPHAGIE 60
   4.1. Régulation par les acides aminés *60*
   4.2. Régulation par les facteurs de croissance *61*
   4.3 Régulation par l'hypoxie *63*
   4.4. Régulation par le calcium *64*
   4.5. Régulation par les phospholipides *64*
5. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE L'AUTOPHAGIE 65
   5.1 Contrôle de la qualité du cytoplasme *65*
   5.2. L'autophagie au cours du développement *66*
   5.3. Autophagie sélective et modulation du protéome *68*

6. AUTOPHAGIE ET CANCER 69
6.1. Rôle anti-tumoral de l'autophagie 69
6.2. Rôle pro-tumoral de l'autophagie 72
6.3. La modulation de l'autophagie pour améliorer les traitements contre le cancer 72
7. AUTOPHAGIE ET MIGRATION CELLULAIRE 73
7.1. Effet pro-migratoire de l'autophagie 74
7.2. Effet anti-migratoire de l'autophagie 76
7.3. Autophagie et transition épithélio-mésenchymateuse 77

OBJECTIFS DE THESE 79

MATERIEL ET METHODES 80

1. PHARMACOLOGIE 80
2. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES ET ARN INTERFERENTS 80
3. CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTIONS 81
4. IMMUNOCYTOCHIMIE ET ANALYSE D'IMAGES 82
5. EVALUATION DE L'ACTIVITE AUTOPHAGIQUE 83
5.1. Marquage au Cyto-ID et cytométrie en flux 83
5.2. Relocalisation des protéines de fusion hrGFP-WIPI1 et EGFP-LC3. 84
5.3. Accumulation de la protéine p62 84
6. ANALYSE DE L'ACTIVITE CALPAÏNE 84
7. TEST DE MIGRATION 85
8. TRANSCRIPTION INVERSE ET PCR QUANTITATIVE (RT-QPCR) 85
9. WESTERN BLOT 86

RÉSULTATS 88

CHEMOTACTIC G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS CONTROL CELL MIGRATION BY REPRESSING AUTOPHAGOSOME BIOGENESIS 88
THE AUTOPHAGY MACHINERY: A NEW PLAYER IN CHEMOTACTIC CELL MIGRATION 127

DISCUSSION 152

1. MODULATION DE L'ACTIVITE AUTOPHAGIQUE PAR DES RCPG CHIMIOTACTIQUES 152
1.1. Inhibition de la formation d'endosomes pré-autophagiques 152
1.2. Rôle essentiel des calpaïnes dans les effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques 155
1.3. Voies de couplage des RCPG chimiotactiques, en amont des calpaïnes 159
2. CONSEQUENCES POTENTIELLES D'UNE MODULATION DE L'AUTOPHAGIE PAR LES RCPG CHIMIOTACTIQUES 162
2.1. Compétition pour une source commune de membrane 162
2.2. Accumulation de protéines d'adhésion à l'avant de la cellule 163
2.3. Accumulation, à l'avant de la cellule, de protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine 165
2.4. Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse 166

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 168

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 171

PUBLICATION ANNEXE 196

Curriculum vitae

COLY Pierre-Michaël
28 ans
25 Place de la Basse Vielle Tour 76000 Rouen
06 67 31 63 24
pierre-michael.coly@univ-rouen.fr

FORMATION

2013-2016: **Doctorat Biologie Cellulaire, spécialité Neurosciences**
Université de Rouen Normandie
Projet: "Régulation de l'activité autophagique par les récepteurs chimiotactiques de type RCPG : rôle dans l'adhésion et la migration directionnelle"
Formations proposées par l'Ecole Doctorale : « Créer Innover », « Management », « Doctoriales Vallée de Seine 2015 »

2011-2013: **Master, Sciences Biomédicales, spécialité Neurosciences**
Université de Rouen Normandie

2007-2011: **Licence Biologie Cellulaire et Physiologie**
Université de Rouen Normandie

2007 **Baccalauréat Scientifique**
Lycée Français de Tananarive, Antananarivo, Madagascar

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2013-2016: **Doctorat Biologie Cellulaire, spécialité Neurosciences**
Université de Rouen Normandie, Laboratoire "Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine" (INSERM U982)
Equipe "Astrocytes et Niche Vasculaire"
Projet: "Régulation de l'activité autophagique par les récepteurs chimiotactiques de type RCPG : rôle dans l'adhésion et la migration directionnelle". (Allocation Ministérielle)
Encadrement de Mlle Héloïse Hamelin (avril-juin 2015) et M. Benjamin Jacob (avril-juin 2016) dans le cadre de leur stage de Master 1, Sciences Biomédicales.

2013: **Stage de recherche (5 mois)**
Université de Rouen Normandie, Laboratoire "Différenciation et communication Neuronale et Neuroendocrine" (INSERM U982)
Equipe "Astrocytes et Niche Vasculaire"
Projet: Modulation de l'activité autophagique par le peptide vasoactif urotensine II

2012: **Stage de recherche (5 mois)**
Université de Rouen Normandie, Laboratoire "Différenciation et communication Neuronale et Neuroendocrine" (INSERM U982)
Equipe "Astrocytes et Niche Vasculaire"
Projet: Induction du microARN 221 par le système urotensinergique

COMPETENCES

Biologie Cellulaire: Culture bactérienne, culture de cellules de mammifère, transfection cellulaire, immunofluorescence, microscopie confocale, cytométrie en flux, test de migration cellulaire en *transwell.*
Biologie Moléculaire: Développement de plasmides recombinants, extraction/purification d'ARN et d'ADN totaux, RT-PCR, extraction/purification de protéines, SDS-PAGE, Western Blot.
Expérimentation Animale: Xénogreffes hétérotopiques de cellules cancéreuses, mesures de tumeurs et injections intratumorales.
Informatique: ImageJ, Imaris, Image Lab, GraphPad Prism, suite Microsoft Office
Langues: Français (langue maternelle), Anglais (bilingue), Portuguais (bilingue)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Coly P.M., Perzo N., Le Joncour V., Lecointre C., Shouft M.T., Tonon M.T., Wurtz O., Gandolfo P., Castel H. et Morin F (2016). Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. Autophagy 12:1-19

Coly P.M., Gandolfo P., Castel H. et Morin F. The autophagy machinery: a new player in chemotactic cell migration. (soumis)

Joubert J.E., Desrues L., Coly P.M., Mutel A., Lecointre C. Perzo, N., Guilhaudis L., Milazzo I., Gandolfo P., Morin, F., Prézeau L., Chabbert M. et Castel H. A key evolutionary proline position – P2.58 – in G protein-coupled receptors controls adhesion and cell polarization during chemotaxis. (en préparation)

COMMUNICATION ORALES

Coly P.M., Perzo N., Le Joncour V., Lecointre C., Tonon M.C., Wurtz O., Gandolfo P., Castel H. and Morin F: Modulation of autophagic activity by chemotactic GPCRs controls the invasive potential of glioblastoma. 1ère Journée Normande de la Recherche Biomédicale, Rouen, 16 septembre 2016. (**Prix de la meilleure communication orale**)

Coly P.M., Perzo N., Le Joncour V., Lecointre C., Tonon M.C., Wurtz O., Gandolfo P., Castel H. and Morin F. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by suppressing autophagosome biogenesis: Involvement in glioma cell invasion. 19th Annual Meeting of the LARC-Neuroscience network, Amiens, 13 Novembre 2015. (**Prix de la meilleure communication orale**).

Coly P.M., Perzo N., Le Joncour V., Lecointre C., Tonon M.C., Wurtz O., Gandolfo P., Castel H. and Morin F. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by suppressing autophagosome biogenesis. 4th Meeting of the GDR 3545 network, Toulouse, 4-6 Novembre 2015.

Coly P.M., Perzo N., Le Joncour V., Lecointre C., Schouft M.T., Tonon M.C., Wurtz O., Gandolfo P., Castel H. and Morin F. GPCR-induced chemotactic migration requires mitigation of autophagy: involvement in glioma cell invasion. 4ème Journée Anuelle de l'IRIB, Rouen, 5 Juin 2015.

Coly P.M., Perzo N., Le Joncour V., Lecointre C., Schouft M.T., Tonon M.C., Wurtz O., Gandolfo P., Castel H. and Morin F. GPCR-induced chemotactic migration requires

mitigation of autophagy: involvement in glioma cell invasion. PeReNe “Final Meeting”, Le Havre, 15-16 Janvier, 2015. (**Prix de la meilleure communication orale**).

Et 10 communications affichées, dont 3 récompensées.

AUTRES ACTIVITES

Représentant des doctorants et post-doctorants, élu au conseil d’unité du laboratoire Inserm U982 (2014-2016)

Président et co-fondateur de l’association des doctorants en Biologie Santé (ADBioS ; 2014-2016)

Participation à la fête de la Science 2015

Membre du comité d’organisation des 18èmes Journées scientifiques de l’Ecole Doctorale NBISE, 2015.

Résumé

L'autophagie est un processus catabolique par lequel certaines protéines cytosoliques sont dirigées vers le compartiment lysosomial, afin d'y être dégradées. Ce processus débute par la séquestration de constituants cytoplasmiques par une structure multimembranaire appelée phagophore. La fermeture du phagophore donne naissance à une vésicule à double membrane nommée autophagosome, qui fusionne avec les lysosomes, ce qui conduit à la dégradation du contenu de sa lumière. Ainsi, la modulation de l'autophagie permet un remodelage dynamique du protéome cellulaire. Bien que des données récentes ont permis de démontrer la dégradation autophagique de protéines impliquées dans la migration cellulaire, telles que des intégrines, ou encore les protéines RhoA et Src, l'impact fonctionnel de l'autophagie sur la migration cellulaire demeure sujet à controverse. Alors que l'autophagie est décrite comme un processus pro-migratoire et pro-invasif dans certaines études, d'autres travaux indiquent que l'inactivation des protéines pro-autophagiques stimule l'invasion des cellules cancéreuses. De plus, l'effet fonctionnel des RCPG chimiotactiques sur l'activité autophagique reste totalement inexploré. Sur la base de ces données, les objectifs de mon travail de thèse ont été *i)* d'évaluer les effets des RCPG chimiotactiques, le CXCR4 et l'UT, sur le processus autophagique et *ii)* d'étudier l'impact de cette modulation sur la migration cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules HEK-293, transfectées à l'aide de construits permettant l'expression des RCPG CXCR4 et UT, ainsi que la lignée de glioblastome humain U87, exprimant ces deux récepteurs de manière endogène.

Nous avons dans un premier temps évalué l'activité autophagique à l'aide de la protéine de fusion EGFP-LC3, marqueur des autophagosomes. Nous avons ainsi démontré que l'activation du CXCR4 et de l'UT provoque une diminution significative de la biogénèse des autophagosomes. Une étape essentielle de cette biogenèse est le recrutement des protéines Atg16L1 et Atg5 à la membrane plasmique, conduisant à la formation d'endosomes Atg16L1-Atg5-positifs, appelés « endosomes pré-autophagiques ». Cette population d'endosomes constitue une source importante de phospholipides nécessaire à l'expansion du phagophore et la formation d'un autophagosome mature. Afin d'évaluer l'impact des RCPG chimiotactiques sur le recrutement de la protéine Atg16L1 à la membrane plasmique, nous avons bloqué le processus d'endocytose par l'utilisation d'un inhibiteur de la dynamine, le *Dynasore*. Cette molécule provoque une accumulation marc ́ le la protéine Atg16L1 dans les endosomes pré-autophagiques en formation, retenus à la membrane plasmique. Nous avons ainsi

démontré que l'activation des RCPG chimiotactiques inhibe fortement le recrutement de la protéine Atg16L1 dans ces endosomes pré-autophagiques. Des études antérieures ont permis de démontrer une interaction directe de l'Atg5 avec les membranes, suggérant que le recrutement de l'Atg16L1 à la membrane plasmique pourrait dépendre de l'Atg5. Ceci nous a incités à évaluer la formation des endosomes pré-autophagiques Atg16L1-positifs suite à une déplétion des taux d'Atg5. Plusieurs ARN interférents ciblant le transcrit codant l'Atg5 ont été testés et, comme attendu, ces ARN interférents bloquent totalement le recrutement de la protéine Atg16L1 dans les endosomes pré-autophagiques en formation. Nous avons, dans un second temps, testé les effets des RCPG chimiotactiques sur la localisation subcellulaire de la protéine Atg5. Par microscopie confocale, nous avons constaté qu'une fraction significative de la protéine Atg5 se localise à la membrane plasmique en conditions basales. L'activation du CXCR4 ou de l'UT s'accompagne d'une diminution marquée du pool d'Atg5 localisée à la membrane plasmique. De plus, nous avons démontré que les effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques sont totalement bloqués par la surexpression d'une protéine Atg5 recombinante, suggérant que ceux-ci sont effectivement relayés par une réduction du pool membranaire de la protéine Atg5.

Plusieurs protéines pro-autophagiques, dont l'Atg5, peuvent être la cible de protéases appelées calpaïnes. L'implication des calpaïnes a également été démontrée dans plusieurs étapes de la migration chimiotactique, telles que la formation des protrusions membranaires et des complexes d'adhésion. Nous avons donc cherché à déterminer si les effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques pouvaient être relayés par l'activation des calpaïnes. Nous avons démontré que l'ensemble des effets anti-autophagiques du CXCR4 et de l'UT sont abolis par l'ALLN, un inhibiteur pharmacologique des calpaïnes 1 et 2. Des résultats similaires ont été obtenus par l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre les calpaïnes 1 ou 2, suggérant que l'expression de ces deux isoformes est nécessaire aux effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques. De manière intéressante, la formation des complexes d'adhésion, ainsi que la migration chimiotactique, induits par le CXCR4 ou l'UT, sont totalement bloqués par l'inhibition des calpaïnes ou la surexpression de la protéine recombinante Atg5 dans les cellules HEK-293 ou les cellules de glioblastome humain U87.

L'ensemble de ces données nous amène à proposer que l'inhibition de l'autophagie, par des RCPG localisés au front de migration, constitue une caractéristique fondamentale du chimiotactisme. Cet événement pourrait permettre de protéger d'une dégradation

autophagique, les protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine ou l'assemblage de complexes d'adhésion. Ces données, révélant un nouveau lien entre la signalisation des RCPG chimiotactiques et l'autophagie, pourraient permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des gliomes de haut grade, particulièrement invasifs.

Abstract

Autophagy is a catabolic process by which certain cytosolic proteins are directed to the lysosomal compartment to be degraded. This process begins with the sequestration of cytoplasmic components, by a multimembrane structure called the phagophore. The closure of the phagophore gives rise to a double membrane vesicle called autophagosome, which then merges with lysosomes in order to degrade its luminal content. Autophagy modulation allows a dynamic remodeling of the cellular proteome. Although recent evidence has demonstrated autophagic degradation of key proteins involved in cell migration, such as integrins, RhoA and the Src kinase, the functional impact of autophagy on cell migration remains controversial. While autophagy is described as a pro-migratory and pro-invasive process in some studies, others indicate that the inactivation of pro-autophagic proteins stimulates the cancer cell invasion. In addition, the functional effect of chemotactic GPCR on autophagic activity remains unexplored. On the basis of these data, the objectives of my thesis were *i)* to evaluate the effects of the chemotactic GPCRs for SDF-1 (CXCR4) and for the vasoactive peptide urotensin II (UT), on the autophagic process and *ii)* to study the impact of this modulation on cell migration. In order to do this, we used HEK-293 cells, transfected with constructs allowing the expression of CXCR4 and UT, as well as the human glioblastoma line, U87, which endogenously expresses these two receptors.

We initially evaluated autophagic activity using the autophagosome marker, the EGFP-LC3 fusion protein. We have thus demonstrated that the activation of CXCR4 and UT causes a significant decrease in autophagosome biogenesis. An essential step in this biogenesis is the recruitment of the Atg16L1 and Atg5 proteins to the plasma membrane, leading to the formation of Atg16L1-Atg5-positive endosomes, called "pre-autophagic endosomes". This population of endosomes constitutes an important source of phospholipids, necessary for the expansion of the phagophore and the formation of a mature autophagosome. In order to evaluate the impact of chemotactic GPCRs on Atg16L1 recruitment to the plasma membrane, we blocked the endocytic process with the use of a dynamin inhibitor, Dynasore. This molecule causes a marked accumulation of Atg16L1 in forming pre-autophagic endosomes, retained at the plasma membrane. We have therefore demonstrated that chemotactic GPCR activation strongly inhibits the recruitment of the Atg16L1 to these pre-autophagic endosomes. Previous studies have demonstrated a direct interaction of Atg5 with membranes, suggesting that recruitment of Atg16L1 to the plasma membrane may depend on Atg5. This

prompted us to evaluate the formation of Atg16L1-positive pre-autophagic endosomes, following depletion of Atg5 levels. Several interfering RNAs, targeting the transcript encoding Atg5, have been tested and, as expected, these interfering RNAs completely blocked the recruitment of Atg16L1 to forming pre-autophagic endosomes. We then tested the effects of chemotactic GPCRs on the subcellular localization of the Atg5 protein. By confocal microscopy, we found that a significant fraction of Atg5 localized to the plasma membrane under basal conditions. The activation of CXCR4 or UT is accompanied by a marked decrease of the Atg5 pool localized at the plasma membrane. Furthermore, we have demonstrated that the anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs are completely abrogated by overexpression of a recombinant Atg5 protein, suggesting that chemotactic GPCRs exert their anti-autophagic effects by reducing the membrane pool of Atg5, necessary for the production of pre-autophagic endosomes, and the expansion of the phagophore.

Several pro-autophagic proteins, including LC3 and Atg5, 12, and 16L1, may be targeted by proteases called calpains. The involvement of calpains has also been demonstrated in several aspects of chemotactic migration, such as the formation of membrane protrusions and adhesion complexes. We therefore sought to determine whether the anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs could be relayed by the activation of calpains. We have demonstrated that all the anti-autophagic effects of CXCR4 and UT are completely blocked in the presence of ALLN, a pharmacological inhibitor of calpains 1 and 2. Similar results have been obtained by using interfering RNAs targeting calpains 1 or 2, suggesting that the expression of these two isoforms is necessary for the anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs. Interestingly, the formation of adhesion complexes, as well as chemotactic migration induced by CXCR4 or UT, are totally abrogated following calpain inhibition or overexpression of the recombinant Atg5 protein in HEK-293 cells, and U87 human glioblastoma cells.

Altogether, these data lead us to propose that autophagy inhibition, by GPCRs located at the cell front, is a fundamental characteristic of chemotactic migration. This event could protect proteins involved in actin cytoskeleton remodeling or adhesion complex assembly, from autophagic degradation. These data, revealing a new link between autophagy and chemotactic GPCR signaling, could allow new therapeutic strategies to be considered in the treatment of high-grade, invasive gliomas.

Liste des abréviations

AC : adénylate cyclase

ALLN : N-acetyL-Leu-Leu-Norleu-al

AMBRA1 : *activating molecule in Beclin-1-related autophagy*

AMP : adenosine monophosphate

AMPc : adenosine monophosphate cyclique

AMPK : *5' adenosin monophosphate-activated protein kinase*

AP2 : *adaptor protein 2*

ARF6 : *ADP-ribosylation factor 6*

ARH : *autosomal recessive hypocholesterolemia*

Arp2/3 : *actin related protein 2/3*

ARPC : *actin related protein 2/3 complex component*

ATCC : *American Type Culture Collection*

Atg : *autophagy-related*

BH3 : *Bcl-2 homology 3*

BNIP3 : *Bcl-2 interacting protein 3*

BNIP3L : *Bcl-2 interacting protein 3-like*

BT2-AMPc : dibutyryl-AMPc

CaMKK2 : *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*

CCD : *coiled-coil domain*

Cdc42 : *cell division control protein 42*

CLIC : *clathrin-independent carriers*

CMA : *chaperone-mediated autophagy*

Dab-2 : *disabled-2*

DDIT4 : *DNA damage inducible transcript 4*

DFCP1 : *double FYVE domain containing protein 1*

DMEM : *Dulbecco's modified Eagle medium*

ECD : *evolutionarily conserved domain*

EEA1 : *early endosome antigen 1*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

ELMO1 : *engulfment and cell motility protein 1*

ERK : *extracellular signal-regulated kinases*

FAK : *focal adhesion kinase*

FIP200 : *focal adhesion kinase-family interacting protein of 200 kDa*

FOXO3 : *forkhead box class O3*

GEF : *guanine nucleotide exchange factor*

GFP : *green fluorescent protein*

GRAF1 : *GTPase regulator associated with FAK*

GRK : *G protein-coupled receptor kinase*

HBSS : *Hank's balanced salt solution*

HCQ : hydroxychloroquine

HIF-1 : *hypoxia inducible factor-1*

hsc70 : *heat shock cognate protein of 70kDa*

IGF-1R : *insulin-like growth factor 1 receptor*

IRSp53 : *insulin receptor phosphotyrosine 53 kDa substrate*

LAMP-2A : *lysosome-associated membrane protein type 2A*

LC3 : *microtubule-associated protein 1-light chain 3*

LIM : Lin-11, Isl-1, Mec-3

LIMK : LIM kinase

LIR : *LC3 interacting region*

LPA : *lysophosphatidic acid*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

mDia : *mammalian Diaphanous*

MEF : *mouse embryonic fibroblast*

MLCK : *myosin light chain kinase*

mLST8 : *mammalian lethal with sec-13 protein 8*

mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex 1*

NBR1 : *neighbor of BRCA1 gene 1*

NDS : *normal donkey serum*

NFE2L2 : *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*

NHE1 : *Na^+/H^+ exchanger 1*

PACS2 : *phosphofurin acidic cluster sorting protein-2*

PB1 : *Phox and Bem1p*

PE : phosphatidyléthanolamine

PI3K-I : phosphoinositide 3-kinase de classe I

PI3K-III : phosphoinositide 3-kinase de classe III

PI3P : phosphatidylinositol 3-phosphate

PI4P : phosphatidylinositol 4-phosphate

PICALM : *phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia*

PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PIP_3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKA : protéine kinase A

PTEN : *phosphatase and tensin homolog*

PTX : toxine pertussique

RAPTOR : *regulotory associated protein of mTOR*

RE : réticulum endoplasmique

RHEB : *RAS homologue enriched in brain*

RUBICON : *RUN domain protein as Beclin-1 interacting cystein-rich containing*

SDF-1 : *stromal cell-derived factor 1*

SSH1 : *protein phosphatase Slingshot homology 1*

SNAP : s*ynaptosomal-associated* protein

SNARE : *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

SNX : *sorting nexin*

SVF : sérum de veau fœtal

T1R1/T1R3 : *taste receptor type 1 members 1 and 3*

TBC1D14 : *Tre-2, Bub2p and Cdc16p 1 domain family member 14*

TCS1/2 *tuberous sclerosis complex*

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TIRF : *total internal reflection fluorescence*

UII : urotensine II

ULK : *uncoordinated 51-like Ser/Thr kinase*

UT : *urotensin II receptor*

UVRAG : *UV irradiation resistance-associated gene*

VAMP : *vesicle associated membrane protein*

Vtib1b : *vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B*

Vps34 : *vacuolar protein sorting 34*

WASP : *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

WAVE : *WASP-family verprolin-homologous protein*

WIPI : *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*

ZF21 : *zinc finger FYVE-type containing protein 21*

Chapitre I : La migration directionnelle

Plusieurs processus physiologiques nécessitent une migration cellulaire coordonnée au sein de l'organisme. Nous pouvons par exemple citer le développement embryonnaire, la surveillance immunitaire ou encore la cicatrisation. La migration cellulaire est également essentielle à la progression de certains processus pathologiques tels que l'invasion tumorale et la formation de métastases. Les études s'intéressant à la migration directionnelle ont démontré que ce mécanisme peut être divisé en plusieurs étapes successives (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Suite à la détection d'un stimulus chimiotactique, la première étape est la polarisation de la cellule, permettant une ségrégation spatiale des différents acteurs de la migration. Celle-ci est suivie par la formation de protrusions membranaires, telles que le lamellum, constitué de fibres contractiles d'actomyosine. A l'avant du lamellum se trouve le lamellipode, une fine structure soutenue par un dense réseau dendritique d'actine. Ces protrusions sont stabilisées par la mise en place de complexes d'adhésion, dont le but est de servir de points d'attache à la matrice extracellulaire. Au cours de l'avancée de la cellule vers le stimulus chimiotactique, les adhésions, naissant dans le lamellipode, se renforcent progressivement avant d'atteindre le lamellum. La contraction des fibres d'actomyosine, au contact des adhésions matures localisées dans le lamellum, permet alors au corps cellulaire de se tracter vers l'avant. Les adhésions, devenues obsolètes, sont finalement désassemblées afin de permettre le détachement de la matrice et le recyclage des protéines d'adhésion vers de nouveaux complexes (Fig. 1).

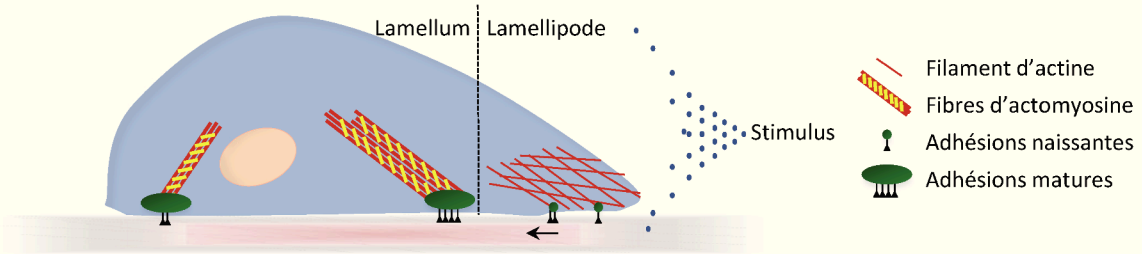


Figure 1 : Les étapes de la migration directionnelle. En réponse à un stimulus chimiotactique, une polymérisation intense d'actine entraine la formation de protrusions à l'avant de la cellule : le lamellum, avec le lamellipode à son extrémité. Des contacts avec la matrice extracellulaire, appelées adhésions naissantes, apparaissent dans le lamellipode afin de le stabiliser. Au cours de l'avancée, ces adhésions se renforcent en contactant des fibres contractiles d'actomyosine dans le lamellum. La contraction de ces fibres d'actomyosine permet donc au corps cellulaire de se tracter vers la source du stimulus chimiotactique.

1. La polarisation

La polarisation cellulaire est la première étape de la réponse adaptative à un signal chimiotactique. Elle est retrouvée chez de nombreux organismes, mais l'essentiel de nos connaissances sur ce sujet provient d'études réalisées sur des leucocytes ou sur l'amibe *D. discoideum*. Ces modèles ont permis d'établir les séquences d'évènements régissant la polarisation cellulaire. Selon la théorie de la « boussole cellulaire » évoquée par Weiner, l'activation de différentes cascades de signalisation en réponse à un gradient chimiotactique va permettre la mise en place de deux pôles dans la cellule, ainsi qu'une répartition subcellulaire des différents acteurs de la migration (Weiner, 2002).

Au somment de la cascade de signalisation, nous retrouvons des récepteurs chimiotactiques capables de lier des molécules chimioattractantes. Grâce à ces récepteurs, les cellules peuvent percevoir des différences de concentrations entre leurs deux pôles de seulement 2-5% (Parent & Devreotes, 1999). Le plus souvent, il s'agit de récepteurs tyrosine kinase ou de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Des études d'imagerie cellulaire utilisant des récepteurs fusionnés à la *green fluorescent protein* (GFP) indiquent que ces récepteurs seraient uniformément répartis à la membrane plasmique afin de percevoir tout changement éventuel des gradients extracellulaires. En effet, il a été démontré que le récepteur à l'AMP cyclique (AMPc), cAR1 chez *D. discoideum* et le récepteur C5aR, dans une lignée dérivée de leucémie, ne subissent pas de relocalisation lorsque les cellules sont soumises à un gradient de concentration de leurs ligands respectifs (Servant *et al*., 1999 ; Xiao *et al*., 1997). Ces données suggèrent que la polarisation cellulaire se ferait grâce à des cascades de signalisation activées localement au pôle le plus exposé, plutôt que par une relocalisation des récepteurs. Il est aujourd'hui admis que la première étape de la polarisation cellulaire est un enrichissement en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP_3) à la membrane plasmique. Cette modification dépend de l'activation et de l'accumulation asymétrique de la phosphoinositide 3-kinase de classe I (PI3K-I) à l'avant de la cellule, où aura lieu la synthèse de PIP_3 à partir de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2 ; Weiner, 2002). Le PIP_3 permet d'activer d'un certain nombre de *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) qui à leur tour stimulent les Rho GTPases RhoA, Rac1 et *cell division control protein 42* (Cdc42). Ces enzymes interagissent avec des protéines effectrices, et orchestrent ainsi la polymérisation des filaments d'actine nécessaire à la formation de protrusions à l'avant de la cellule (Takai *et al.*, 2001). RhoA est généralement associée aux

évènements précoces de la polymérisation des filaments d'actine, ainsi qu'à l'activité contractile des fibres d'actomyosine. La protéine Rac1 est, quant à elle, impliquée dans la mise en place et l'élargissement du lamellipode. Enfin, Cdc42 participe essentiellement à la formation des filopodes (Huveneers & Danen, 2009). D'une manière générale, il est considéré que les activités de RhoA et Rac1 sont séparées d'un point de vue spatio-temporel. L'activité de RhoA est antérieure et intervient dans l'initiation et l'élongation des protrusions cellulaires. Rac1 est active plus à arrière, et stimule des voies impliquées dans le renforcement et la stabilisation de ces protrusions (Machacek *et al*., 2009). Par ailleurs, Rac1 peut stimuler le recrutement et/ou l'activation de la PI3K-I à la membrane plasmique, ce qui constitue un rétrocontrôle positif renforçant la polarisation. Ainsi, l'expression d'un mutant constitutivement actif de Rac1 est suffisant pour engendrer la formation de PIP_3 à la membrane plasmique (Srinivasan *et al*., 2003).

Pour que la « boussole cellulaire » soit maintenue, l'activité des Rho GTPases ne doit être contenue qu'au pôle avant de la cellule. Il est donc nécessaire de limiter l'accumulation de PIP_3 dans les autres régions cellulaires. Ce rétrocontrôle est exercé par la 5' lipide *phosphatase and tensin homolog* (PTEN). Alors que la PI3K-I se localise à l'avant d'une cellule en réponse à un gradient chimiotactique, PTEN est retrouvée à l'arrière et dans les régions latérales (Merlot & Firtel, 2003). Le rôle principal de PTEN est de contrer les effets de la PI3K-I, en convertissant le PIP_3 en PIP_2. Il a été démontré que la délétion du gène codant PTEN, dans une lignée cellulaire de fibroblastes, conduit à une élévation de l'activité des Rho GTPases et provoque un étalement cellulaire non dirigé, tandis que sa surexpression tend à inhiber ce phénomène (Liliental *et al*., 2000 ; Tamura *et al*., 1998). De récentes études réalisées avec la technique de microscopie *total internal reflection fluorescence* (TIRF) ont permis de suivre la localisation dynamique du PIP_3 et de PTEN. Elles démontrent que ces deux entités semblent exercer un rétrocontrôle négatif l'une sur l'autre. En effet, une diminution du signal PIP_3 sur une portion de membrane s'accompagne d'une élévation du signal PTEN, et *vice-versa* (Gerisch *et a*l., 2012). Alors que la réduction des taux de PIP_3 est liée à son hydrolyse PTEN-dépendante, l'exclusion de PTEN du front de migration des leucocytes dépend de l'activation de Cdc42, qui comme nous l'avons vu, dépend elle-même du PIP_3 (Li *et al*., 2003). Ces données indiquent qu'il existe plusieurs boucles de rétrocontrôle travaillant conjointement afin d'initier et de maintenir la polarité cellulaire.

2. La dynamique de l'actine

Les filaments d'actine sont des éléments essentiels à la migration cellulaire. Les cellules se servent du cytosquelette d'actine à la fois pour former des structures protrusives dans le sens du déplacement, mais également pour générer les forces intracellulaires nécessaires à la traction du corps cellulaire. En réponse à un signal chimiotactique, des monomères d'actine (G-actine) se polymérisent pour former des filaments double-brin (F-actine). Cette polymérisation se fait à la périphérie de la cellule, et permet de repousser la membrane vers l'extérieur, provoquant alors l'apparition des protrusions. Il existe deux principaux types de protrusions, qui diffèrent selon le mode de polymérisation de l'actine : le lamellipode, pourvu de filaments branchus, et le filopode, dont les filaments se regroupent parallèlement pour former des faisceaux (Lambrechts *et a*l., 2004).

2.1. Le lamellipode

Le lamellipode est le type de protrusion cellulaire le mieux caractérisé. Il s'agit d'une fine structure de cytoplasme (0,1 à 0,2 µm d'épaisseur) qui s'étend à l'avant de la cellule. Il est constitué d'un réseau de filaments d'actine organisés de manière presque orthogonale (Welch & Mullins, 2002). Le bord antérieur du lamellipode est une zone où la polymérisation des filaments d'actine est continuelle. L'extrémité (+) des filaments est orientée vers la membrane plasmique. L'ajout de nouveaux monomères se fait donc entre le filament et la membrane plasmique, et permet de la repousser vers l'extérieur afin d'assurer la croissance du lamellipode (Ridley *et al*., 2003). Alors que le PIP_3 est reconnu comme étant un signal déclencheur de la polymérisation, il a été proposé que le PIP_2, qui décore le feuillet interne de la membrane plasmique, puisse constituer un marqueur orientant l'élongation des filaments d'actine vers l'extérieur. Par le déplacement de protéines de coiffe capables de bloquer la polymérisation en recouvrant les extrémités (+) des filaments, le PIP_2 pourrait limiter l'élongation des filaments à une seule direction (Insall & Weiner, 2001 ; Schafer *et al.*, 1996). L'ajout de nouveaux monomères contribue également à faire reculer les filaments d'actine jusqu'au bord postérieur du lamellipode, où ceux-ci se dépolymérisent.

Le réseau à l'aspect dendritique, caractéristique des lamellipodes, se forme en grande partie grâce au complexe *actin related protein 2/3* (Arp2/3) composé d'Arp2, Arp3, ainsi que de cinq autres protéines : *actin related protein 2/3 complex component 1-5* (ARPC1 à ARPC5). Le complexe se lie à l'extrémité (+) libre d'un filament d'actine dit « mère » et

constitue de nouveaux points de nucléation d'où vont pouvoir émerger deux filaments « filles ». Les protéines Arp2 et Arp3 forment un hétérodimère similaire aux dimères d'actine, et joueraient le rôle de patron pour la croissance de deux filaments séparés d'un angle de 70° (Ridley *et al.*, 2011 ; Welch & Mullins, 2002). L'activation du complexe Arp2/3 est permise par les protéines de la famille *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP) qui comprend WASP elle-même, N-WASP, WASH, WHAMM et les *WASP-family verprolin-homologous protein 1-3* (WAVE 1-3). Les protéines WAVE sont comprises dans des complexes pentamériques activés par Rac1 à l'avant de la cellule et seraient les seuls membres à contribuer directement à l'élongation du lamellipode, alors que WASH et N-WASP participent aux phénomènes d'endocytose (Veltman & Insall, 2010). La cortactine, recrutée au niveau du complexe Arp2/3 et des filaments « filles » néosynthétisés, a pour rôle de stabiliser le réseau d'actine ramifié, et donc de renforcer la rigidité mécanique du lamellipode. De plus, des travaux ont démontré que des fibroblastes ayant subi une délétion du gène codant la cortactine présentent une activité Cdc42 réduite, ainsi qu'une migration altérée (Lai *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que la cortactine, en plus de son rôle stabilisant, participerait à la migration cellulaire en contribuant à l'activation de cette Rho GTPase. C'est cet équilibre entre élongation et formation d'embranchements qui permet la croissance et le maintien du lamellipode (Fig. 2).

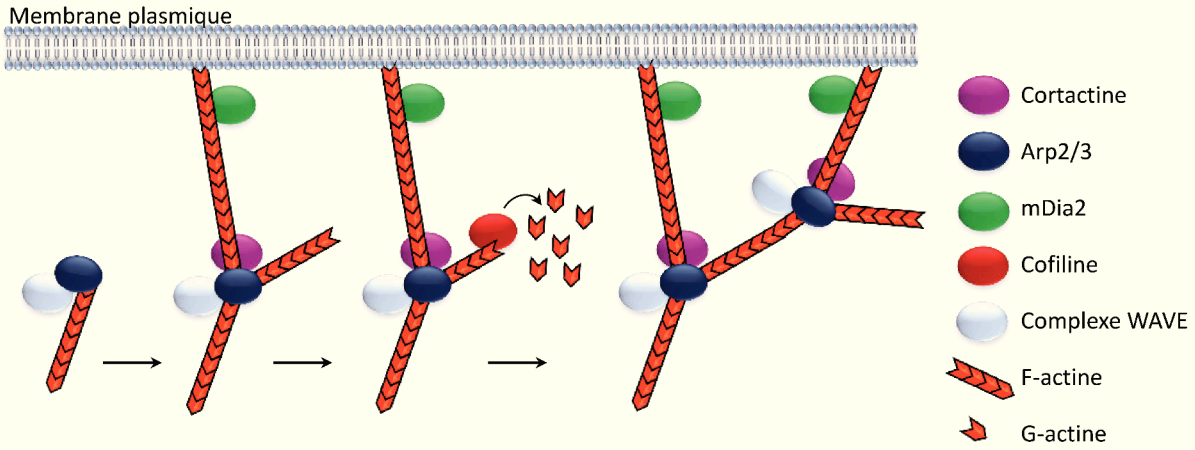


Figure 2 : La formation du lamellipode. L'extension du lamellipode nécessite la polymérisation des filaments d'actine en un réseau dendritique repoussant la membrane plasmique. La protéine Arp2/3, activée par le complexe WAVE, est recrutée au niveau de l'extrémité (+) des filaments d'actine mère, suite à leur clivage par la cofiline, afin d'y former des embranchements. La cortactine vient ensuite stabiliser les filaments filles. En protégeant les filaments des protéines de coiffe, la protéine mDia2 permet une l'élongation des filaments d'actine vers la membrane plasmique

L'élargissement du lamellipode se fait en grande partie grâce à l'action de la cofiline. Son rôle principal est de sectionner des filaments d'actine, créant ainsi de nouvelles extrémités (+) libres où le complexe Arp2/3 pourra se fixer et amorcer la formation de nouvelles ramifications. L'expansion du lamellipode est ainsi soumise à une régulation fine de l'activité de la cofiline, cyclant entre trois compartiments : la membrane plasmique, le compartiment F-actine et le cytosol. La cofiline, localisée à la membrane plasmique, est maintenue sous une forme inactive, par son interaction avec le PIP_2 (Fig. 3). Sa translocation vers le compartiment F-actine peut être induite par une réduction des taux de PIP_2, sous l'action de la phospholipase Cγ activée par l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR ; Mouneimne *et al.*, 2004). Une modulation locale du pH participe également au « décrochage » de la cofiline. Ainsi, en réponse à un signal chimiotactique, l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ 1 (NHE1) provoque un efflux de protons H^+ responsable d'une élévation du pH au front de migration. Cet efflux induit alors une déprotonation de la cofiline, réduisant son affinité pour le PIP_2 (Frantz *et al.*, 2008). Une fois dissociée de la membrane, la cofiline peut exercer son activité en clivant la F-actine. La dépolymérisation qui s'ensuit permet de constituer des réserves de G-actine nécessaires à l'élongation de nouveaux filaments. La cofiline forme alors un complexe avec la G-actine, qui ne peut plus se lier à la membrane ou aux filaments. Ce complexe diffuse vers le cytosol, où la cofiline est phosphorylée et libérée de la G-actine par la protéine kinase *LIM domain kinase 1* (LIMK1) (Delorme *et a*l., 2007 ; van Rheenen *et al.*, 2009). Un nouveau cycle débute lorsque la cofiline est déphosphorylée par la *protein phosphatase Slingshot homology 1* (SSH1) et retourne à la membrane plasmique ou au compartiment F-actine.

D'autres protéines contribuent à l'extension du lamellipode. C'est notamment le cas des protéines de la famille des formines, telles que mDia1 et mDia2 (*mammalian Diaphanous1-2*). Ces protéines sont activées par RhoA à l'avant du lamellipode. Elles se positionnent au niveau de l'extrémité (+) des filaments d'actine, et favorisent leur élongation en les protégeant des protéines de coiffe, capables de bloquer la polymérisation. Leur rôle est ainsi de permettre une extension sans ramifications des filaments d'actine (Chesarone *et al.*, 2010).

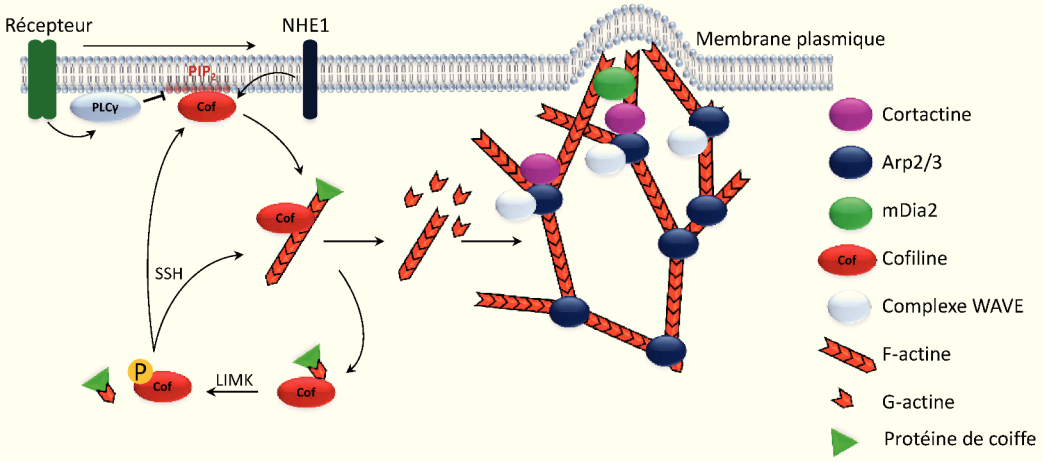


Figure 3 : Le cycle de la cofiline. Au niveau de la membrane plasmique, la cofiline est maintenue inactive par sa liaison au PIP_2. En réponse à un signal chimiotactique, l'activation de la phospholipase Cγ, ainsi que l'élévation de pH par la NHE1, contribuent au décrochage de la cofiline. Elle peut alors cliver les filaments d'actine, les débarrassant des protéines de coiffe et permettant alors la construction du réseau dendritique d'actine. La cofiline diffuse alors vers le cytosol où elle est libérée de la G-actine, grâce à une phosphorylation par la LIMK. Un nouveau cycle de clivage peut débuter après la déphosphorylation de la cofiline par SSH.

2.2. Le filopode

Les filopodes sont de fines structures cylindriques qui s'étendent à partir de la membrane plasmique et ont pour rôle d'explorer le milieu environnant. Ils contiennent, en effet, des récepteurs tels que l'EGFR qui, par les cascades de signalisation associées, participent à l'orientation de la cellule (Lidke *et al.*, 2005). Le filopode est composé de regroupements de filaments d'actine parallèles, reliés entre eux par une protéine réticulante appelée fascine (Machesky & Lia, 2010). Il existe deux modèles décrivant la formation des filopodes. Le premier propose qu'ils émergent du lamellipode, à partir du réseau nucléé par les complexes Arp2/3 (Gupton & Gertler, 2007). Le second modèle suggère que les filopodes pourraient se former à partir de la membrane plasmique, indépendamment du complexe Arp2/3 et du lamellipode (Schirenbeck *et al.*, 2005). Dans les deux cas, la Rho GTPase Cdc42 orchestre la formation du filopode en activant plusieurs effecteurs, dont mDia2 et *insulin receptor phosphotyrosine 53 kDa substrate* (IRSp53) à la membrane plasmique. La protéine mDia2 joue un rôle essentiel en favorisant la polymérisation des monomères d'actine, et permet donc l'élongation rapide des filaments, sans ramifications (Mellor, 2010). La protéine IRSp53, quant à elle, interagit avec la membrane grâce à des liaisons électrostatiques. Ces

interactions déforment la membrane à la base du filopode afin de faciliter sa formation. IRSp53 est également capable de recruter un certain nombre de régulateurs de la polymérisation de l'actine qui constituent la machinerie de nucléation au point d'émergence du filopode (Ahmed *et al.*, 2010). Parmi ces derniers, nous pouvons citer les protéines de la famille Ena/VASP, qui, bien que recrutées par IRSp53, se localisent rapidement à l'extrémité du filopode en cours de croissance afin de protéger les filaments d'actine des protéines de coiffe (Bear & Gertler, 2009 ; Fig. 4).

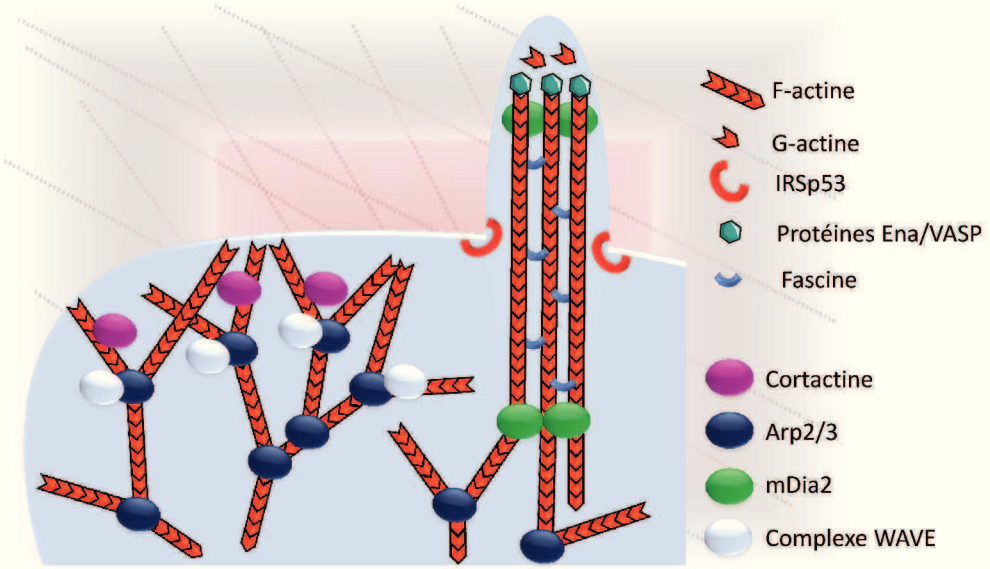


Figure 4 : La formation du filopode. L'extension du filopode repose essentiellement sur l'action de la protéine mDia2 qui permet une croissance sans embranchement des filaments d'actine. Ces filaments sont reliés entre eux par la fascine. IRSp53 est responsable de la courbure de la membrane à la base du filopode. A l'extrémité du filopode, les protéines Ena/VASP favorisent la polymérisation des filaments d'actine.

3. Les adhésions

Au cours de la migration, la cellule va devoir former des adhésions transitoires avec la matrice extracellulaire (MEC). Ces adhésions ont à la fois un rôle structurant et signalisant. Leur fonction structurale est de relier la MEC au cytosquelette d'actine. Cette connexion stabilise le lamellipode et constitue des points d'attache qui permettent à la cellule de se tracter vers l'avant. Les adhésions fonctionnent également comme des centres signalisants capables de contrôler la polarité cellulaire et la structure du cytosquelette. Afin que l'avancée de la cellule soit optimale, la dynamique d'assemblage et de désassemblage des adhésions doit être finement régulée et spatio-temporellement couplée à la croissance du lamellipode. En

ce sens, il est aujourd'hui admis que la dynamique des adhésions cellulaires dépend des activités collectives des différentes Rho GTPases citées précédemment (Nobes & Hall, 1995; Rottner *et al*., 1999).

3.1. La composition de la matrice extracellulaire

La MEC est présente dans tous les tissus de l'organisme et procure un support essentiel aux cellules. Bien qu'elle soit en grande partie constituée d'eau, plusieurs types de protéoglycanes et de protéines fibreuses participent à sa composition. Celle-ci est unique à chaque tissu, et leur confère donc des propriétés biochimiques et biomécaniques particulières (Frantz *et al.*, 2010).

Les protéoglycanes remplissent la majorité de l'espace extracellulaire et lui donnent un aspect de gel hydraté (Järveläinen *et al*., 2009). Ils ont des fonctions variées qui sont le reflet de leurs structures et de leurs propriétés biophysiques (Iozzo & Murdoch, 1996). Ils participent ainsi au maintien de l'homéostasie tissulaire en jouant un rôle de filtre, de tampon, ou encore d'hydratant. Etant essentiellement extracellulaires, les protéoglycanes se retrouvent en amont de plusieurs cascades de signalisation et peuvent donc moduler les processus de prolifération, d'adhésion et de migration. Certains agissent même comme des co-récepteurs en facilitant la rencontre d'un ligand et de son récepteur (Schaefer & Schaefer, 2010).

Les principales protéines fibreuses de la MEC sont les collagènes, les élastines, les fibronectines et les laminines. Parmi elles, le collagène représente l'élément structural capital de la MEC et constitue d'ailleurs environ 30 % de la masse protéique totale des organismes multicellulaires (Frantz *et al*., 2010). Sa fonction première est de former des fibres qui servent d'échafaudage, que viennent renforcer d'autres protéines de la MEC, telles que l'élastine. Comme leur nom l'indique, les fibres d'élastine fournissent une élasticité aux tissus qui subissent des étirements répétés. Cette propriété semble être particulièrement importante dans le système vasculaire. Une délétion monoallélique du gène codant l'élastine chez la souris engendre une rigidification de la paroi aortique et s'accompagne d'une élévation de la pression artérielle (Pezet *et al*., 2013). La fibronectine est un autre exemple de protéine fibreuse de la MEC. Cette protéine contient une motif asparagine, glycine, aspartate (RGD) qui permet sa liaison avec les intégrines, principaux récepteurs de l'adhésion cellulaire (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987).

3.2. Les différents types d'adhésions

Des études protéomiques indiquent que la régulation des adhésions fait intervenir plus de 180 acteurs, reliés par plus de 700 interactions (Zaidel-Bar & Geiger, 2010). Ces chiffres illustrent la complexité de ces structures, qui est nécessaire pour accommoder leur grande dynamique. Plusieurs types d'adhésions sont observables dans une cellule en cours de migration. Celles-ci diffèrent par leur taille, leur stabilité et leur composition protéique, facteurs reflétant leur degré de maturation. Les adhésions naissantes sont les premières structures à apparaitre et se forment dans le lamellipode. Ces structures sont de petite taille (0,2 μm^2 environ) et n'ont d'ailleurs pu être décrites que grâce à la technique de microscopie TIRF (Choi *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'actine, la taline et la paxilline étaient présentes au sein de ces structures (Choi *et al.*, 2008 ; Lawson *et al.*, 2012). Le rôle de chacune de ces protéines sera détaillé ultérieurement. Les adhésions naissantes ont une courte durée de vie (environ 60 secondes) et ne sont pas présentes au-delà du lamellipode. Leur destin est donc soit d'évoluer en structures plus stables appelées complexes focaux, soit de se désassembler (Fig. 5).

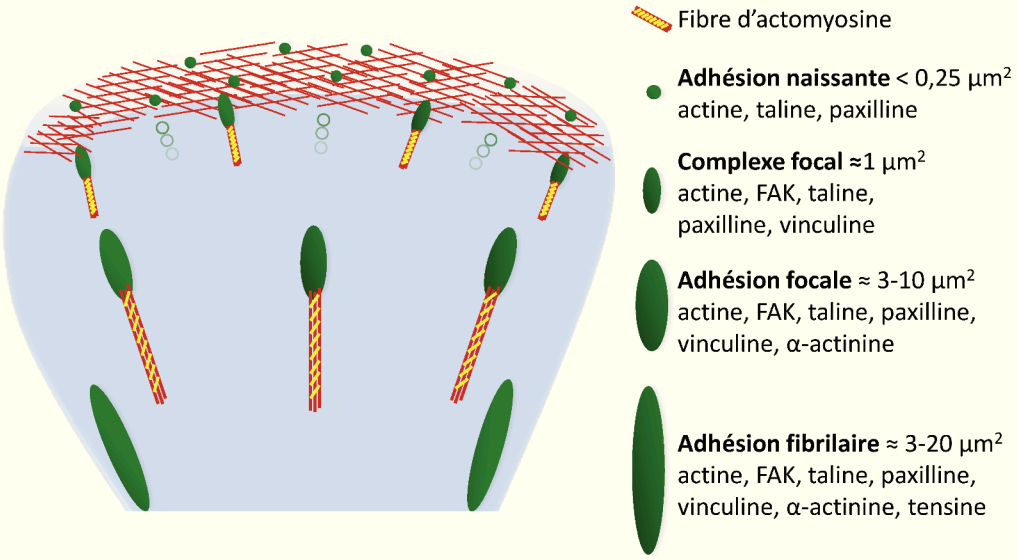


Figure 5 : Caractéristiques des différentes formes d'adhésions. Les adhésions naissantes apparaissent dans le lamellipode. Au cours de l'avancée de la cellule, elles pourront soit se désassembler, soit s'élargir et évoluer en des formes plus stables que sont les complexes focaux, les adhésions focales et les adhésions fibrillaires.

Les complexes focaux commencent à apparaitre à la limite entre le lamellipode et le lamellum. Ils sont plus larges que les adhésions naissantes (environ 1 μm^2) et sont caractérisés par le recrutement de la vinculine, renforçant l'interaction entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (DePasquale & Izzard, 1987). Les complexes focaux peuvent perdurer plusieurs minutes avant de poursuivre leur maturation.

Du fait de leurs tailles (3-10 μm^2), les adhésions focales sont les structures adhérentes les mieux décrites à ce jour. Elles ont une morphologie plus allongée et sont localisées à la fois à la périphérie et dans la portion centrale de la cellule. Les adhésions focales ont initialement été étudiées dans les années 60-70. Les premières observations, réalisées par *interference reflection microscopy*, avaient mis en évidence des zones de contacts serrés entre la cellule et le substrat (Curtis *et al*., 1964 ; Izzard & Lochner, 1976). A peu près à la même période, d'autres études ont permis d'observer ces mêmes structures, décrites comme des plaques denses associées à l'extrémité de paquets de filaments d'actine (Abercrombie *et al.*, 1971; Heath & Dunn, 1978).

Les adhésions fibrillaires sont les structures adhérentes les plus larges et représentent la dernière étape de maturation des adhésions. Leur morphologie s'apparente à des fibrilles ou à des allongements de points de contact avec la MEC, sur une longueur pouvant aller de 3 µm à 20 µm. Elles se localisent principalement au centre de la cellule et leur présence est surtout observée dans les fibroblastes. Leur formation est associée à la fibronectine, aux intégrines $\alpha5\beta1$ et à la tensine (Zaidel-Bar *et al*., 2004).

Au cours de leur maturation, la morphologie des adhésions passe donc d'un aspect ponctiforme à une structure polaire allongée avec une extrémité distale et un « talon » proximal d'où émergent les filaments d'actine (Wolfenson *et al*., 2009). Bien que des différences de composition protéique soient observées entre les divers types d'adhésions, celles-ci semblent être dans la continuité l'une de l'autre plutôt que des classes distinctes (Zamir *et al*., 1999). Selon le type cellulaire étudié, la gamme complète des adhésions ne sera pas nécessairement retrouvée. De plus, une corrélation inverse entre la taille moyenne des adhésions et la vitesse de migration a été démontrée (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Ainsi les cellules des lignées myéloïdes, telles que les neutrophiles et les macrophages, forment des adhésions petites et dynamiques (adhésions naissantes et complexes focaux) facilitant leurs mouvements rapides (≈10 µm/min). Les cellules plus contractiles, comme les fibroblastes, forment quant à elles des adhésions plus stables (adhésions focales et adhésions fibrillaires) et

se déplacent plus lentement (<1µm/min) (Parsons *et al.*, 2010). D'une manière générale, il est considéré que l'activité de Rac1 est associée à la formation de complexes focaux, alors que leur maturation en adhésions focales dépend de RhoA (Nobes & Hall, 1995 ; Rottner *et al.*, 1999).

3.3. L'assemblage des complexes d'adhésion

Comme précisé précédemment, les adhésions naissantes sont les premières structures adhérentes à apparaitre au cours de la migration cellulaire. En plus de constituer un premier lien physique entre la MEC et le réseau d'actine, elles transmettent des signaux mécaniques qui stimuleront leur maturation.

L'activation des intégrines est la première étape de la formation des adhésions naissantes. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. Ces protéines possèdent une longue portion extracellulaire, capable de lier divers composants de la MEC, tels que le collagène ou la fibronectine (Margadant *et al.*, 2011). Les intégrines peuvent adopter différentes conformations, ayant des affinités variables pour leur ligand. Elles sont initialement présentes à la surface cellulaire dans une conformation dite inactive, incapable de lier efficacement la MEC. L'activation des intégrines peut se faire par des signaux cytoplasmiques, selon un mécanisme d'activation nommé *inside-out*. La liaison d'un agoniste sur un récepteur chimiotactique déclenche une cascade de signalisation menant à la fixation d'une protéine appelée taline au niveau de la queue cytoplasmique des intégrines β. Cette liaison engendre une modification allostérique des intégrines vers une conformation active, plus affine pour les composants de la MEC (Tadokoro *et al.*, 2003 ; Fig. 6). Afin que la liaison des intégrines à la MEC soit maximale, les intégrines doivent être regroupées en *clusters* locaux, ce qui a pour conséquence d'augmenter leur avidité pour le substrat. Le mécanisme par lequel les intégrines se regroupent reste encore mal compris. Il a néanmoins été suggéré que, *via* leurs domaines transmembranaires, les sous-unités α et β puissent former des homodimères et homotrimères respectivement (Li *et al.*, 2003). Les protéases calcium-dépendantes, appelées calpaïnes, semblent jouer un rôle essentiel dans les mécanismes d'activation *inside-out* et de *clustering* des intégrines. Ainsi, le clivage calpaïne-dépendant de la taline augmente son affinité pour la queue cytoplasmique de l'intégrine β3 (Yan *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été démontré que les calpaïnes pouvaient également cibler la queue cytoplasmique de l'intégrine β3, ce qui facilite le regroupement de ces dernières (Bialkowska *et al.*, 2000). Enfin, il est à noter que

l'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine D interfère avec l'assemblage des adhésions. Ceci suggère que l'initiation des adhésions est intimement liée à la formation du réseau dendritique d'actine au sein du lamellipode, favorisant l'ancrage localisé des protéines d'adhésion, et ainsi, le regroupement des intégrines (Choi *et al.*, 2008).

Il a été suggéré que le signal d'activation des intégrines puisse aussi provenir du milieu extracellulaire, à savoir des composants de la MEC tels que la fibronectine (Schwartz *et al.*, 1995). Ce mode d'activation, appelé *outside-in*, est moins bien caractérisé, mais il a été proposé que les modifications conformationelles induites par la liaison d'un ligand aux intégrines pourraient se propager à travers la membrane et altérer les domaines cytoplasmiques (Fig. 6). Il a été démontré que les intégrines peuvent être activées par la liaison d'un anticorps à leurs portions extracellulaires, et ce, même lorsque les niveaux de taline ont été déplétés (Campbell & Humphries, 2011 ; Tadokoro *et al.*, 2003). Cette hypothèse est également renforcée par des études utilisant des billes recouvertes de ligands de la MEC. Cet outil provoque le regroupement des intégrines ainsi que l'accumulation locale de protéines signalisantes, dont Rac1 et RhoA (Miyamoto *et al.*, 1995).

La limite entre le lamellipode et le lamellum est une zone de transition où débute la maturation des adhésions naissantes. Lors de pauses dans l'avancée du lamellipode, une fraction des adhésions naissantes augmente en taille, en s'allongeant de manière centripète. Cette maturation est contrôlée par l'établissement de contacts avec les filaments d'actine, regroupés et orientés par l'α-actinine et plus tard, par la myosine II, formant des fibres d'actomyosine. Les adhésions ne contactant pas les fibres d'actomyosine, et ne subissant donc pas leurs sollicitations mécaniques, se désassemblent rapidement à la base du lamellipode (Choi *et al.*, 2008).

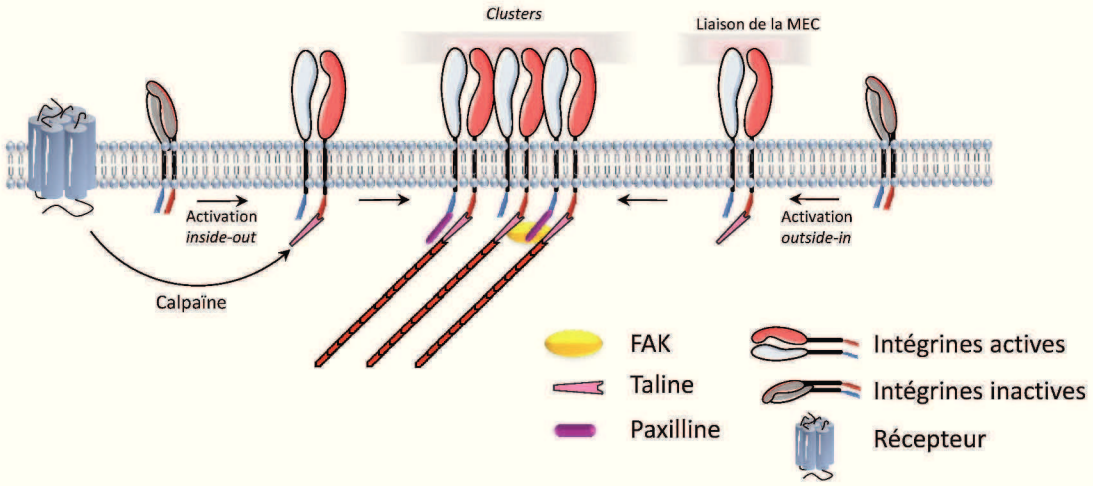


Figure 6 : L'activation des intégrines. L'activation des intégrines peut se faire par des voies intracellulaires (*inside-out*). L'activation d'un récepteur chimiotactique stimule le clivage calpaïne-dépendant de la taline et du domaine cytoplasmique de l'intégrine β. Ces évènements augmentent l'affinité de la taline pour les intégrines, engendrent des changements conformationels au niveau des domaines extracellulaires et permet le regroupement des intégrines. L'activation des intégrines peut également être initiée par un mécanisme extracellulaire. La liaison aux composés de la MEC contribue au « dépliement » des intégrines et à leur regroupement. La taline permet d'établir un contact initial entre les intégrines et les filaments d'actine. La paxilline et la FAK sont ensuite rapidement recrutées.

Le recrutement des partenaires protéiques au sein des complexes d'adhésion se fait de manière séquentielle et utilise les fibres d'actomyosine comme patron (Choi *et al*., 2008). De ce fait, la composition exacte d'un complexe d'adhésion dépend étroitement de son stade de maturation. La paxilline est l'une des premières protéines à être recrutée après la taline. Malgré sa taille relativement petite (68 kDa), la paxilline contient plusieurs sites de liaison qui lui permettent d'interagir avec des protéines structurantes et signalisantes. Elle possède en effet quatre domaines LIM (Lin-11, Isl-1, Mec-3) près de son extrémité C-terminale. Il s'agit de motifs en double doigts de zinc par lesquels des interactions protéine-protéine sont possibles. La paxilline va ainsi pouvoir jouer un rôle d'adaptateur moléculaire favorisant la maturation progressive du complexe d'adhésion (Turner, 2000). Parmi les partenaires protéiques pouvant se lier aux domaines LIM, nous pouvons citer la vinculine, certaines intégrines α, ainsi que les tyrosine kinases Src et *focal adhesion kinase* (FAK) (Brown *et al*., 1996). La phosphorylation de la paxilline par la FAK crée de nouveaux sites de fixation pour d'autres partenaires de la paxilline (Turner, 2000). La FAK participe également au recrutement de la taline dans les complexes d'adhésion, indépendamment de la liaison taline-intégrine β1 (Lawson *et al.*, 2012).

La vinculine fait partie des protéines recrutées aux complexes d'adhésion en réponse à une tension mécanique. Elle est composée d'une tête globulaire et d'un domaine queue, reliés par une séquence riche en prolines. Grâce à sa tête en N-terminale, elle peut se fixer à la taline, tandis que sa portion C-terminale peut lier les filaments d'actine (Humphries *et al*., 2007). Sous l'effet de tensions créées par les fibres d'actomyosine, la taline peut être étirée de 5 à 8 fois, ce qui révèle des sites de liaison pour la vinculine (Margadant *et al*., 2011 ; Rio *et al.*, 2009). Le recrutement de la vinculine au niveau de la taline est essentiel pour renforcer la liaison entre les filaments d'actine et les complexes d'adhésion. Le lien entre la taline et l'actine peut, en effet, être brisé par des forces dépassant 2 piconewtons. Une fois renforcées,

les adhésions peuvent résister à des forces plus intenses, allant jusqu'à 20 piconewtons (Hirata *et al.*, 2014). La zyxine est un autre exemple de protéine recrutée en réponse à une tension mécanique. Elle est recrutée au niveau des adhésions focales, mais se relocalise sur les fibres d'actomyosine en réponse à une tension mécanique. Cette relocalisation est associée à un épaississement des fibres, suggérant que la zyxine est impliquée dans la transduction de signaux mécaniques en une réponse cellulaire permettant de renforcer le cytosquelette d'actine (Yoshigi *et al.*, 2005 ; Fig. 7).

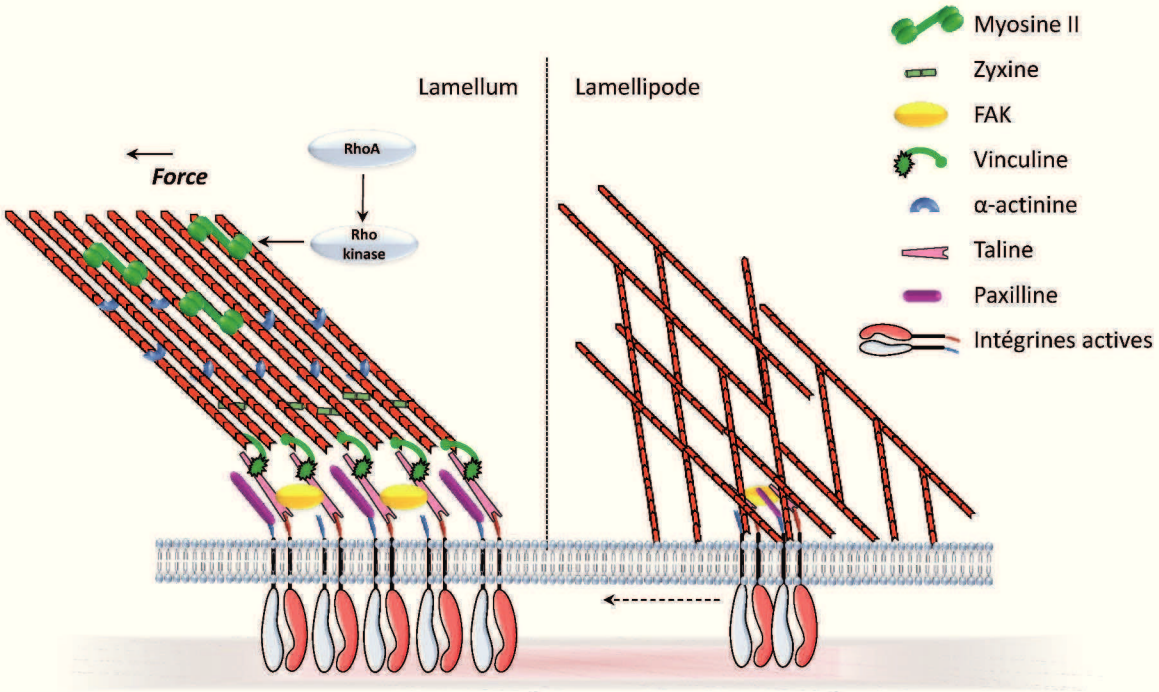


Figure 7 : L'assemblage des complexes d'adhésion. Le mouvement rétrograde des adhésions naissantes les amène à la limite entre le lamellipode et le lamellum, où le contact avec les fibres d'actomyosine déclenche leur maturation en complexes focaux, puis en adhésions focales. En effet, la voie RhoA/Rho kinase stimule l'activité contractile de la myosine II, essentielle au recrutement de protéines telles que la vinculine et la zyxine. Les forces exercées par les fibres d'actomyosine permettent également à la cellule de se tracter vers l'avant.

La formation et la stabilisation des complexes d'adhésion permettent aux cellules d'exercer une force de traction nécessaire à l'avancée de la cellule. La contraction des fibres dépend de la myosine II. Cette protéine est composée de deux chaines lourdes, deux chaines légères essentielles et deux chaines légères régulatrices. L'activité motrice est stimulée par la phosphorylation réversible des chaines régulatrices par la *myosin light chain kinase* (MLCK). La MLCK est elle-même régulée par la voie RhoA. A l'inverse, l'activation de Rac1 inhibe la

MLCK, ce qui a pour effet d'inhiber les phénomènes de contraction au profit de l'étalement cellulaire (Parsons *et al.*, 2010 ; Ridley *et al.*, 2003 ; Vicente-Manzanares *et al.*, 2005).

3.4. Le désassemblage des complexes d'adhésion

Le désassemblage des adhésions est une étape indispensable de l'avancée de la cellule. Bien que le phénomène ait initialement été observé à l'arrière de la cellule au cours de la rétractation de la « queue » cellulaire, nous savons aujourd'hui qu'il se déroule également à l'avant pour permettre le recyclage des protéines d'adhésion vers de nouveaux complexes, processus appelé *turnover*. Le désassemblage est principalement médié par des évènements de phosphorylation, ainsi que par le clivage de plusieurs protéines d'adhésion par les calpaïnes.

La FAK joue à la fois un rôle dans la maturation des complexes d'adhésion et dans leur désassemblage. Cependant, son inhibition se répercute davantage sur ce dernier point puisqu'elle mène à une accumulation d'adhésions stables (Ilić *et al.*, 1995). En se liant à la kinase Src, la FAK permet de multiples phosphorylations de la paxilline. Cet évènement contribue à la dissociation des adhésions en modifiant l'affinité de la paxilline pour ses partenaires (Webb *et al.*, 2004). Le complexe FAK-Src est aussi impliqué dans le recrutement de la calpaïne 2 et de son activateur, *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), dans les complexes d'adhésion (Carragher *et al.*, 2003). Enfin, la FAK participe également au recrutement de la dynamine, une protéine essentielle à l'endocytose clathrine-dépendante des intégrines (Ezratty *et al.*, 2005).

Le rôle des calpaïnes dans le désassemblage des complexes d'adhésion a été largement caractérisé. L'inhibition des calpaïnes, par la calpastatine ou par l'agent pharmacologique N-acetyL-Leu-Leu-Norleu-al (ALLN), empêche le *turnover* des complexes (Bhatt *et al.*, 2002). Plusieurs protéines des complexes, dont la taline, la paxilline, la FAK et la vinculine peuvent, en effet, être clivées par les calpaïnes 1 et/ou 2 (Chan *et al.*, 2007 ; Franco & Huttenlocher, 2005 ; Franco *et al.*, 2004 ; Serrano & Devine, 2004). Parmi ces cibles, la taline semble être primordiale puisque l'expression d'une protéine mutée, résistante au clivage, ralentit fortement le désassemblage des adhésions et empêche le *turnover* de la vinculine, la zyxine et la paxilline (Franco *et al.*, 2004).

L'importance du réseau de microtubules au cours de la dissociation des adhésions a été démontrée par l'utilisation du nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules. Le traitement des cellules avec cet agent stabilise les complexes d'adhésion,

renforçant alors l'ancrage des cellules à la MEC. Le retrait du nocodazole du milieu de culture entraine une élongation des microtubules vers les adhésions. La formation de contacts entre les microtubules et les complexes d'adhésion est corrélée avec un désassemblage massif des complexes (Kaverina *et al.*, 1999). Il a alors été proposé que la croissance des microtubules vers les points de contact puisse y apporter des acteurs du désassemblage, tels que la calpaïne, afin d'amorcer le processus. Un rôle de la protéine *zinc finger FYVE-type containing protein 21* (ZF21) dans le recrutement des calpaïnes a récemment été décrit. La protéine ZF21 possède, en effet, des domaines de liaison pour la calpaïne 2, mais également pour la β-tubuline, la FAK et le PI3P (Nagano *et al.*, 2012). Les auteurs proposent que ZF21 pourrait permettre le transport de la calpaïne 2 le long des microtubules, et *via* une liaison à la FAK, faciliter l'amarrage des microtubules aux complexes d'adhésion (Nagano *et al.*, 2012). Une délétion du gène codant ZF21 ralentit considérablement le processus de désassemblage ainsi que la motilité cellulaire (Nagano *et al.*, 2010 ; Fig.8).

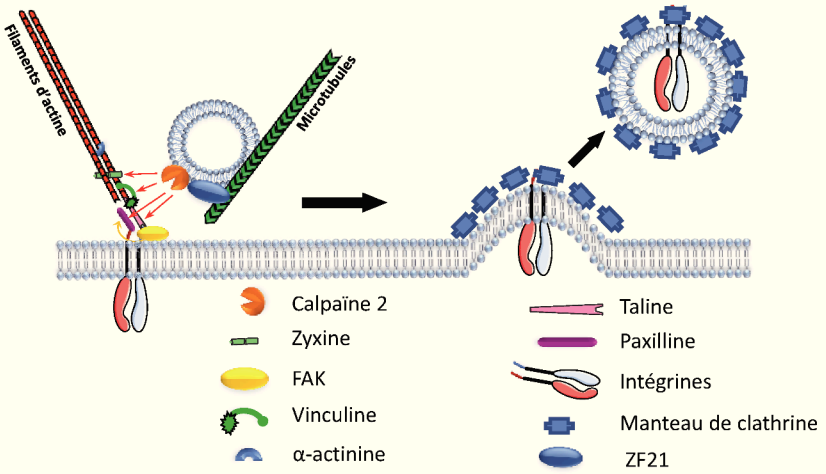


Figure 8 : Le désassemblage des adhésions. Le modèle actuel propose que des signaux de déstabilisation soient amenés aux sites d'adhésion *via* les microtubules et la protéine ZF21. L'un de ces signaux est la calpaïne 2, qui peut cliver la zyxine, la vinculine, la paxilline et la taline. La phosphorylation de la paxilline par la FAK contribue également au désassemblage des adhésions. Des protéines adaptatrices de la clathrine, telles que l'AP2, sont ensuite recrutées et participent à l'endocytose des intégrines. Celles-ci sont alors recyclées vers le front de migration ou dégradées.

Le phénomène d'ubiquitinylation est également impliqué dans le *turnover* des adhésions. Plusieurs ubiquitine-ligases E3 ont été identifiées au cours d'études protéomiques cherchant à définir la composition des adhésions (Winograd-Katz *et al.*, 2014 ; Zaidel-Bar *et*

al., 2007). De plus, il a été démontré qu'un certain nombre de protéines, dont la FAK, la paxilline et les intégrines, peuvent être ubiquitinylées lors du désassemblage des adhésions (Huang, 2014). L'ubiquitine peut constituer un signal de reconnaissance pour une dégradation par le protéasome ou par l'autophagie. Dans le cas de l'autophagie, plusieurs types de récepteurs cargos, tels que *neighbor of BRCA1 gene 1* (NBR1) ou p62, peuvent se fixer aux substrats ubiquitinylés, ainsi qu'à la protéine autophagique *microtubule-associated protein 1-light chain 3* (LC3), afin de diriger leurs cargos vers cette machinerie de dégradation (Kenific *et al*., 2016). Des travaux récents indiquent que l'autophagie peut également réguler le *turnover* des adhésions indépendamment de NBR1 et p62. La phosphorylation de la paxilline par la kinase Src augmente son interaction avec la protéine LC3 et facilite alors sa dégradation (Sharifi *et al*., 2016).

3.5. L'endocytose des intégrines

La dernière étape du désassemblage des complexes d'adhésion concerne le devenir des intégrines. Bien qu'il arrive qu'une partie des intégrines soit arrachée de la cellule et abandonnée sur la matrice (Palecek *et al.*, 1998), la plupart des intégrines sont internalisées suite au désassemblage des adhésions afin d'être dégradées ou recyclées vers de nouveaux sites d'adhésion (Margadant *et al*., 2011). Parmi les différents modes d'internalisation que peuvent emprunter les intégrines, l'endocytose clathrine-dépendante est aujourd'hui la mieux caractérisée. Ce mode d'endocytose repose sur l'assemblage d'un manteau protéique dans lequel s'invagine la membrane plasmique. Cette structure dépend de protéines adaptatrices, telles que le complexe *adaptor protein 2* (AP2), capables de lier à la fois le PIP_2 et le cargo à endocyter. Les molécules de clathrine s'assemblent pour former la couche externe du manteau. Elles permettent le recrutement de protéines accessoires impliquées dans le courbage de la membrane, la motilité de la vésicule et plus tard, le désassemblage du manteau. La scission de la vésicule se fait grâce au recrutement de la dynamine. Il s'agit d'une GTPase en forme de spirale qui applique une torsion autour du « col » de l'invagination afin de rompre la membrane (Mousavi *et al*., 2004 ; Fig. 9). Il a été démontré que plusieurs acteurs de cette machinerie d'endocytose se localisent rapidement au niveau des adhésions en cours de dissociation. C'est le cas de la dynamine, ainsi que de la clathrine et ses adaptateurs, *Disabled-2* (Dab-2), *autosomal recessive hypercholesterolemia* (ARH) et Numb (Ezratty *et al*., 2009 ; Nishimura & Kaibuchi, 2007). Ces adaptateurs reconnaissent un motif NPxY localisé dans la portion cytoplasmique des intégrines β, puis interagissent avec la clathrine et

la dynamine afin de réguler l'endocytose des intégrines. Une déplétion des niveaux de Dab-2, d'ARH, de Numb ou de clathrine par des ARN interférents suffit pour ralentir le désassemblage des complexes d'adhésion ainsi que la migration de fibroblastes (Ezratty *et al.*, 2009, 2005 ; Nishimura & Kaibuchi, 2007). Il a récemment été montré que le complexe AP2, l'adaptateur le plus abondant de la clathrine, était également impliqué dans l'endocytose des intégrines. L'AP2 peut se lier à la portion cytoplasmique des intégrines α2 et α4 afin de permettre leur endocytose (De Franceschi *et al.*, 2016).

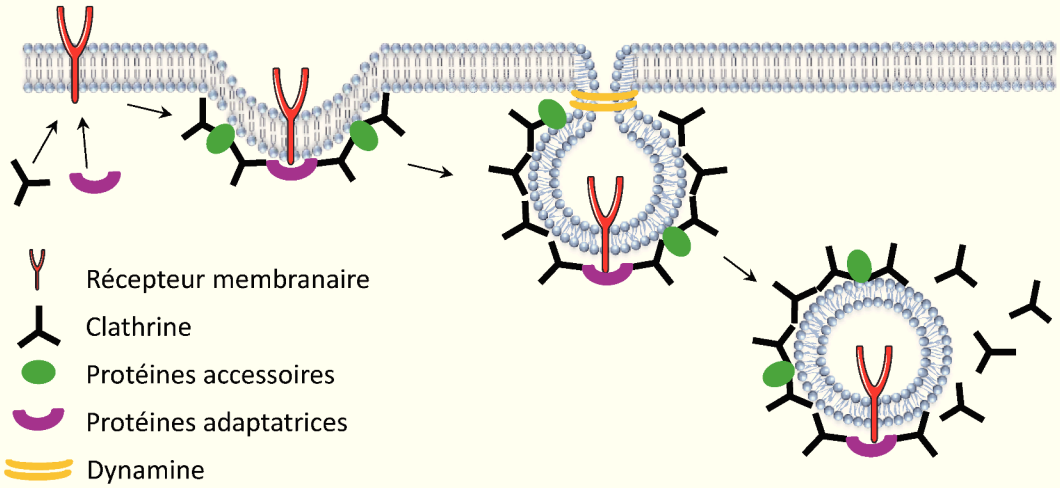


Figure 9 : L'endocytose clathrine-dépendante. La reconnaissance d'un cargo à endocyter se fait grâce aux protéines adaptatrices de la clathrine telles que l'AP2, Dab2, ARH ou Numb. La clathrine s'assemble alors autour des protéines adaptatrices et recrute des protéines accessoires impliquées dans la formation des invaginations, la motilité des vésicules ou le désassemblage du manteau. Le recrutement de la dynamine permet ensuite la scission de la vésicule. Une fois internalisée, la vésicule d'endocytose commence à perdre son manteau de clathrine.

Il a longtemps été suggéré que l'internalisation des intégrines se produisait principalement à l'arrière d'une cellule en migration, afin de faciliter le détachement de la queue cellulaire (Bretscher, 1996). Cependant, nous savons aujourd'hui que l'endocytose se produit également à l'avant de la cellule où elle est tout aussi essentielle à la migration chimiotactique. Les premières études cherchant à localiser les acteurs moléculaires de l'endocytose clathrine-dépendante ont démontré que les invaginations recouvertes de clathrine ne semblaient pas particulièrement compartimentées. Bien que la queue cellulaire soit relativement dépourvue de ces invaginations, il apparait qu'elles sont distribuées de manière homogène dans le reste de la cellule (Rappoport & Simon, 2003). Un constat similaire peut

être fait pour les adaptateurs Dab2, AP2 ainsi que pour l'internalisation de la transferrine, un cargo fréquemment utilisé pour étudier l'endocytose clathrine-dépendante. Des expériences d'immunodétection indiquent qu'ils sont retrouvés de manière uniforme dans les cellules (Howes *et al*., 2010 ; Nishimura & Kaibuchi, 2007). Cependant, grâce à des techniques de microscopie à feuille de lumière, une distribution asymétrique de l'AP2 a récemment été démontrée dans une lignée cellulaire issue de glioblastome. Les auteurs ont démontré que la face ventrale du lamellipode-lamellum était dépourvue de vésicules à AP2, alors qu'elles se forment continuellement sur la face dorsale (Kural *et al*., 2015). Il a été proposé que l'AP2 puisse être impliquée dans le transport des intégrines de la face dorsale de la cellule vers la face ventrale (Bridgewater *et al.*, 2012). Une polarisation marquée est également observable pour ce qui est de la distribution de l'adaptateur Numb. Celui-ci est concentré dans les puits à clathrine à l'avant de la cellule où il participerait au désassemblage des adhésions (Nishimura & Kaibuchi, 2007).

3.6. Le recyclage des intégrines

La migration cellulaire doit être finement régulée d'un point de vu spatiotemporel. En ce sens, le trafic vésiculaire est primordial de par sa capacité à contrôler la localisation des différents acteurs, dont ceux qui sont liés aux membranes tels que les intégrines. Il est bien établi que les intégrines sont rapidement transportées entre la membrane plasmique et les endosomes. Pour certaines intégrines, il est estimé que le pool à la surface est recyclé au moins une fois toutes les 30 minutes (Paul *et al.*, 2015). Une fois internalisées, une partie des intégrines peut être dirigée vers une voie de dégradation lysosomiale. C'est notamment le cas lorsque les intégrines sont trop fortement liées à leur ligand. Suite à sa liaison à la fibronectine, l'intégrine α5β1 peut être ubiquitinylée au niveau de la queue cytoplasmique de l'α5. L'ubiquitine pourrait ici être un indicateur d'intégrines devenues obsolètes, ne pouvant donc pas être recyclées vers de nouvelles adhésions (Lobert *et al*., 2010). La plupart des intégrines sont cependant recyclées vers la membrane plasmique. Cette décision semble être influencée par les protéines *sorting nexin 17* (SNX17) et *sorting nexin 31* (SNX31). En se liant aux domaines cytoplasmiques des intégrines β, au niveau des endosomes précoces, ces protéines de tri peuvent détourner les intégrines vers la voie de recyclage (Böttcher *et al*., 2012; Tseng *et al.*, 2014). De là, les intégrines peuvent retourner à la surface en empruntant une voie courte Rab4-dependante ou une voie plus longue qui repose sur Rab11 et *ADP-ribosylation factor 6* (ARF6), en passant par le compartiment périnucléaire de recyclage

(Bridgewater *et al.*, 2012). Le chemin emprunté pourrait dépendre du statut d'activation des intégrines. Il a été démontré que les intégrines β1 actives et inactives suivent le même chemin vers les endosomes précoces. Les β1 inactives sont cependant rapidement recyclées *via* la voie Rab4 alors que les β1 actives passent par le compartiment périnucléaire de recyclage avant d'être adressées à la membrane plasmique (Arjonen *et al.*, 2012). Les mécanismes régulant ce tri restent encore mal compris, mais le but d'un trafic plus long pourrait être de permettre le détachement du ligand et le retour à la surface d'une intégrine libre. N'ayant pas lié la matrice, les intégrines inactives n'auraient pas besoin de ce détour et seraient alors rapidement recyclées (Fig. 10).

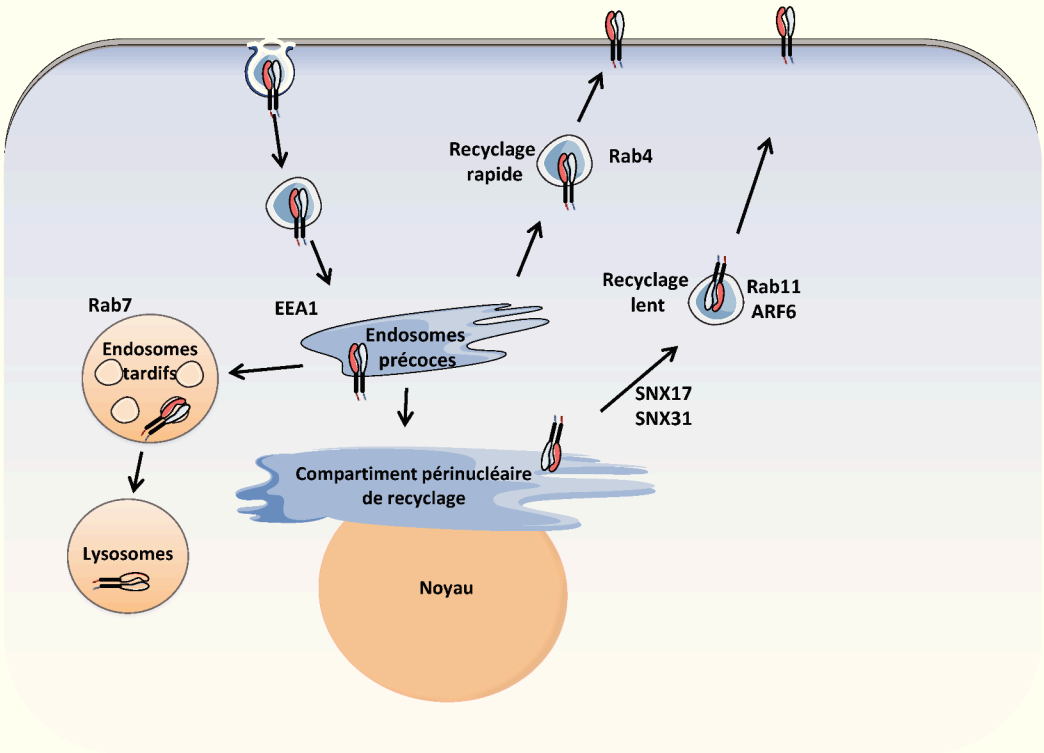


Figure 10 : Le trafic intracellulaire. Les intégrines internalisées sont dirigées vers le compartiment des endosomes précoces. De là, elles peuvent soit *i)* emprunter la voie Rab4-dépendante et rapidement retourner à la membrane plasmique, soit *ii)* suivre une voie plus longue passant par le compartiment périnucléaire de recyclage et les endosomes de recyclage Rab11- et ARF6-positifs. Les intégrines peuvent également être dirigées vers une voie de dégradation qui repose sur les endosomes tardifs et les lysosomes.

Dans des cellules en cours de migration, les évènements d'exocytose sont concentrés à l'avant (Schmoranzer *et al.*, 2003). En plus d'externaliser les protéines requises au front de migration, telles que les intégrines, ce phénomène pourrait apporter une source de

phospholipides nécessaires à l'expansion rapide du lamellipode. Pour que les phospholipides provenant d'une source interne puisse être incorporés à la membrane plasmique, les deux membranes doivent fusionner par un processus qui dépend des protéines *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE) (Jahn & Scheller, 2006). Une protéine R-SNARE se localise sur le compartiment donneur et se lie à un complexe Q-SNARE présent sur la membrane ciblée pour former un complexe trans-SNARE. Les protéines SNARE peuvent ainsi moduler la migration cellulaire en contrôlant la localisation de ses acteurs. *Synaptosomal-associated protein 29* (SNAP29) est par exemple impliquée dans le recyclage des intégrines β1. La perte de SNAP29 s'accompagne d'une rétention intracellulaire des intégrines β1 et ralentit alors la vitesse de migration des fibroblastes (Rapaport *et al*., 2010). La R-SNARE *vesicle associated membrane protein 3* (VAMP3) participe également au recyclage des intégrines (Riggs *et al*., 2012). La stimulation de macrophages par le peptide chimioattractant *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, engendre une redistribution marquée d'endosomes de recyclage VAMP3-positifs vers le lamellipode. Cette polarisation de l'exocytose fait intervenir le complexe Stx4/SNAP23. Celui-ci est localisé sur toute la surface d'une cellule statique, mais se retrouve concentré au front de migration d'une cellule en mouvement. Il constitue alors le partenaire Q-SNARE de VAMP3 et permet la fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique. L'inhibition de SNAP23 ou de VAMP3 par des ARN interférents ou par des dominants négatifs réduit l'adressage des intégrines au front de migration et empêche l'expansion du lamellipode (Skalski *et al*., 2010 ; Veale *et al*., 2010).

4. Contrôle de la migration par des RCPG chimiotactiques

Avec plus de 800 gènes identifiés chez l'Homme, les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires (Fredriksson *et al*., 2003). Il s'agit de récepteurs membranaires pouvant interagir avec des protéines G, et possédant 7 domaines transmembranaires d'environ 25-35 résidus. Leur rôle est de traduire un signal extracellulaire en une cascade de signalisation intracellulaire qui modulera l'activité de la cellule. Les ligands des RCPG sont extrêmement variés, allant de molécules organiques odorantes aux peptides, en passant par des lipides et même des photons. Ces récepteurs régissent alors une large gamme de fonctions physiologiques telles que la pression artérielle, la neurotransmission et le chimiotactisme. Le nombre, la localisation et la diversité de ces récepteurs en ont fait des cibles thérapeutiques majeures. Plusieurs RCPG sont impliqués

dans les processus de migration cellulaire. Les ligands de ces récepteurs sont alors considérés comme des molécules chimioattractantes et regroupent principalement les chimiokines, les lipides bioactifs et les peptides vasoactifs.

4.1 Les récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines constituent une large famille de cytokines chimioattractantes de faible poids moléculaire (8 à 10 kDa) pouvant initier les processus de migration directionnelle en se fixant à leur RCPG. La plupart des chimiokines contiennent quatre résidus cystéine dans leur séquence peptidique, et sont classées en quatre sous-catégories selon la position des deux premières cystéines : CC, CXC, C ou CX_3C. Les récepteurs sont quant à eux nommés en fonction de la nature de leurs ligands. Ainsi nous pouvons par exemple associer les récepteurs CCR1 à CCR9 aux chimiokines de types CC, et les récepteurs CXCR1 à CXCR5 aux chimiokines de type CXC (Murphy *et al.*, 2000). A ce jour, une cinquantaine de chimiokines ainsi qu'une vingtaine de leurs RCPG ont été identifiés. Bien qu'ils aient initialement été décrits dans le contexte de la réaction inflammatoire aigüe, nous savons aujourd'hui que les RCPG aux chimiokines sont impliqués dans d'autres processus physiologiques nécessitant une migration cellulaire, tels que la cicatrisation et l'angiogenèse. Leur implication dans des contextes pathologiques, tels que la progression tumorale, a également été démontrée et fait d'ailleurs l'objet de nouvelles stratégies thérapeutiques (Raman *et al.*, 2012).

L'un des récepteurs aux chimiokines le mieux caractérisé est le CXCR4, du fait de son rôle dans l'internalisation du virus de l'immunodéficience humaine ainsi que pour son implication dans la progression de nombreux cancers (Chatterjee *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 1996). Les récepteurs peuvent généralement lier plusieurs chimokines différentes. Le CXCR4 semble cependant être plus sélectif, puisqu'un seul ligand endogène a été identifié à ce jour : le *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), aussi connu sous le nom de CXCL12 (Murphy *et al.*, 2000).

Le CXCR4 peut déclencher un certain nombre de cascades de signalisation régulant divers processus biologiques. Suite à la liaison du SDF-1, des modifications conformationnelles s'opèrent au niveau du récepteur et permettent l'activation de protéines G hétérotrimériques, et la dissociation de la sous-unité Gα des Gβγ. Ces dernières pourront activer des voies de signalisation plus en aval afin d'orchestrer la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire. Le rôle central des sous-unités Gβγ semble

être l'activation directe de la PI3K-I (Rubin, 2009 ; Stephens *et al*., 1994). Le récepteur activé par son ligand se comporte comme une GEF permettant l'échange d'un GDP contre un GTP au niveau de la sous-unité Gα. Bien que le CXCR4 puisse activer plusieurs classes de sous-unités Gα, il est majoritairement couplé à la $G\alpha_i$ et la $G\alpha_q$ (Teicher & Fricker, 2010). Le Dr Maghazachi fut l'un des premiers à démontrer que le CXCR4 pouvait être couplé à plusieurs isoformes de la Gα. En traitant des lymphocytes avec des anticorps bloquants dirigés contre des sous-unités spécifiques, il a montré que la $G\alpha_q$ était nécessaire à l'induction du chimiotactisme par le SDF-1 (Maghazachi, 1997). La plupart des fonctions du CXCR4, dont le chimiotactisme, sont cependant sensibles à un traitement à la toxine pertussique (PTX), suggérant un rôle essentiel de la famille des $G\alpha_i$ (Rubin, 2009). Par l'ADP-ribosylation d'un résidu cystéine situé à l'extrémité C-terminale de la sous-unité α_i, cette toxine bactérienne inhibe toute la cascade de signalisation se trouvant en aval de la protéine G (Kaslow *et al*., 1992). La protéine $G\alpha_i$ est un inhibiteur direct de l'adénylate cyclase (AC) et permet de réduire la production d'AMPc. D'une manière générale, l'AMPc peut inhiber la migration cellulaire en augmentant l'activité de la PKA (*protein kinase A*). Bien que ses effets semblent varier d'un type cellulaire à l'autre, la PKA peut inhiber la MLCK, essentielle à l'activation de la myosine II, et donc à la maturation des adhésions (Burdyga *et al*., 2013 ; Chen *et al.*, , 2008). Par ailleurs, dans une lignée cellulaire issue d'un cancer du sein, il a récemment été démontré que la sous-unité $G\alpha_{i2}$ est capable d'interagir avec l'une des GEF de Rac1, *engulfment and cell motility protein 1* (ELMO1), en réponse à une stimulation par le SDF-1. Cette interaction semble être indispensable à l'activation de Rac1 ainsi qu'au chimiotactisme induit par l'activation du CXCR4 (Li *et al*., 2013 ; Fig. 11).

La désensibilisation est une caractéristique commune à la signalisation de plusieurs RCPG. Il s'agit de la perte de réponse à un stimulus extracellulaire, *via* l'endocytose du récepteur. Il a été démontré que les *G protein-coupled receptor kinase* (GRK) ainsi que les β-arrestines sont impliquées dans ce processus de désensibilisation. Suite à la liaison de l'agoniste, la phosphorylation de l'extrémité C-terminale cytosolique du RCPG induit le recrutement de la β-arrestine, permettant d'initier le processus d'endocytose (Krupnick & Benovic, 1998). Les β-arrestines induisent l'internalisation des récepteurs en interagissant avec des protéines de l'endocytose, telles que l'AP2 et l'ARF6 (Lefkowitz, 2011). Il a été ainsi démontré qu'une réduction des taux de β-arrestine2 dans des lymphocytes, diminue le phénomène de désensibilisation et augmente le couplage du CXCR4 aux protéines G. Cependant ces cellules présentent également une perte de réponse chimiotactique envers le

SDF-1, suggérant que l'internalisation du RCPG est essentielle à ses propriétés chimiotactiques (Fong *et al.*, 2002). En effet, le couple β-arrestine2/CXCR4 forme une plateforme intracellulaire signalisante, capable d'induire l'activation des MAPK p38 et ERK1/2 (Luttrell *et al.*, 2001 ; Rubin, 2009). Ces kinases favorisent alors la migration cellulaire en participant à l'activation et/ou au recrutement de la paxilline, de la MLCK, des calpaïnes et de la FAK (Huang *et al.*, 2004). Il est à noter que des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules HEK-293 transfectées, surexprimant le CXCR4. Dans ces cellules, des ARN interférents dirigés contre la β-arrestine2 bloquent l'activation de p38 et d'ERK, ainsi que la migration directionnelle induite par le SDF-1 (Cheng *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2002). Une fois internalisés, certains RCPG peuvent être déphosphorylés et redirigés vers la membrane plasmique (Krueger *et al.*, 1997).

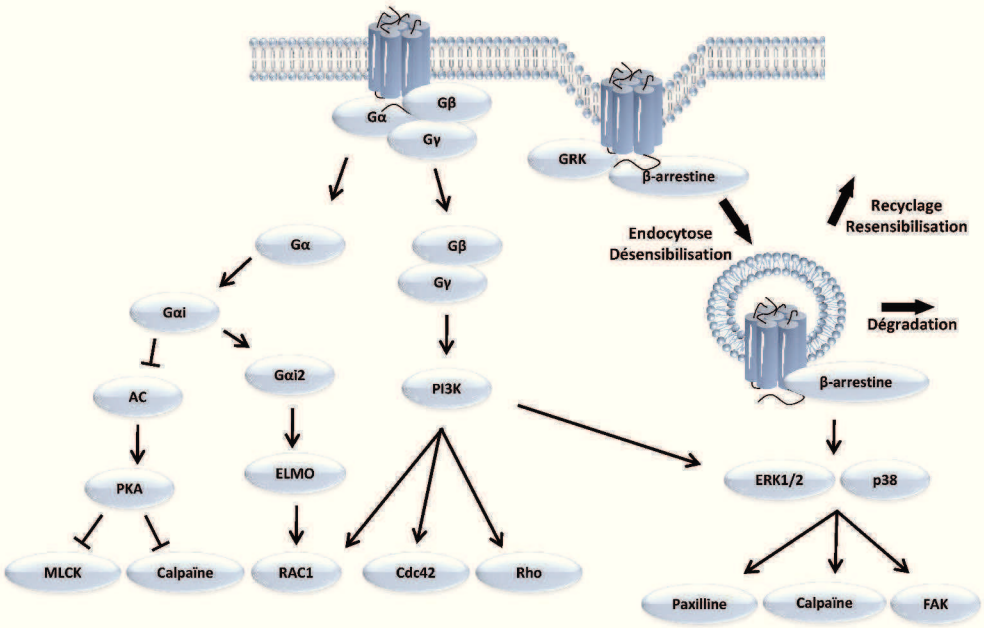


Figure 11 : Représentation schématique des principales voies de signalisation associées à la protéine G_i.

4.2. Les récepteurs aux peptides vasoactifs

Des hormones telles que l'angiotensine II et les endothélines sont bien connues pour leurs effets sur le système cardiovasculaire, d'où leur appartenance à la famille des peptides dits vasoactifs. Certains de ces peptides sont également capables d'agir sur la migration cellulaire. A titre d'exemple, des travaux ont démontré que la liaison de l'angiotensine II à

son RCPG induit la migration de cellules musculaires lisses, alors que l'endothéline-1 peut stimuler celle des cellules endothéliales (Daher *et al*., 2008 ; Xi *et al*., 1999)

L'urotensine II (UII) est un peptide vasoactif cyclique de 11 acides aminés. A la fin des années 90, il a été identifié comme étant le ligand du RCPG orphelin GPR14, plus tard renommé *urotensin II receptor* (UT). L'UII et l'UT ont d'abord été caractérisés pour leurs effets sur le système cardiovasculaire, pour lequel il a été démontré que l'activation de l'UT pouvait stimuler la constriction de l'ensemble des artères. Il a d'ailleurs été démontré que l'UII était 10 à 20 fois plus puissant que l'endothéline 1 chez le rat, le macaque et l'homme, ce qui lui a obtenu le titre de peptide vasoactif le plus puissant à ce jour (Ames *et al*., 1999 ; Maguire & Davenport, 2002). Les effets chimiotactiques de l'UII ont été observés dans un certain nombre de types cellulaires, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore pleinement élucidés. L'UII peut ainsi stimuler la migration de monocytes et de cellules endothéliales en induisant une réorganisation du cytosquelette d'actine par l'activation de la voie RhoA/Rho kinase (Segain *et al*., 2007 ; Xu *et al*., 2009). De plus, notre équipe a récemment démontré que l'UII pouvait induire le couplage du récepteur UT à différents effecteurs tels que les protéines G_q, G_i et les β-arrestines 1 et 2, favorisant alors l'activation de la voie ERK1/2 et à la migration chimiotactique des cellules HEK-293 (Brulé *et al*., 2014 ; Jarry *et al*., 2010). Dans des lignées cellulaires dérivées de gliomes, il a été démontré que la voie G_{13}/Rho/Rho kinase ainsi que la voie G_i/PI3K-I sont activées suite à un traitement à l'UII, menant à un remodelage du cytosquelette d'actine et à la migration de ces cellules (Lecointre *et al*., 2015). Ces données viennent renforcer des études précédentes ayant démontré que les effets pro-migratoires de l'UII dépendaient de la voie ERK dans des cellules musculaires lisses (Matsusaka & Wakabayashi, 2006), ainsi que des voies des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et RhoA/Rho kinase dans des fibroblastes (Xu *et al*., 2009 ; Zhang *et al*., 2008).

4.3. Lipides bioactifs

Plusieurs lipides tels que l'acide lysophosphatidique (LPA) ou la sphingosine-1-phosphate sont également capables de réguler la migration chimiotactique. Du fait de leur capacité à exercer des effets biologiques, ils appartiennent à la famille des lipides dits bioactifs. A titre d'exemple, il a été démontré que le LPA pouvait accélérer la croissance tumorale en modulant à la fois l'angiogenèse et l'invasion tumorale, deux processus caractérisés par une migration cellulaire accrue (Blackburn & Mansell, 2012 ; Contos *et al*.,

2000). A ce jour, cinq RCPG pouvant lier le LPA ont été identifiés : LPA_1 à LPA_5. Les effets pro-migratoires du LPA semblent être essentiellement relayés par les récepteurs LPA_2 et LPA_3. Ils sont couplés aux protéines G_i, G_q et $G_{12/13}$ et peuvent alors activer les voies MAP kinases, PI3K-I/TIAM1/Rac et RhoA/Rho kinase (Blackburn & Mansell, 2012 ; Lin *et al.*, 2010).

5. Rôle des RCPG chimiotactiques dans l'invasion tumorale

Dans le contexte du cancer, les voies de la migration peuvent être reprogrammées afin de favoriser la dissémination des cellules cancéreuses. L'invasion tumorale et la formation de métastases qui en résultent sont en effet des caractéristiques importantes de la progression de plusieurs types de cancers malins (Roussos *et al.*, 2011). La diffusion des cellules cancéreuses comporte plusieurs étapes : le détachement des cellules de la tumeur primaire, l'adhésion à la MEC, la dégradation de la MEC et la migration directionnelle. Cette dernière étape repose sur les mécanismes décrits précédemment. Les fibroblastes associés aux cancers sont une composante importante de la progression tumorale (Xing *et al.*, 2010). Ils peuvent dériver de cellules épithéliales ou endothéliales, et constituent une source importante de molécules chimioattractantes, dont des chimiokines, qui pourront être perçues par des récepteurs localisés à la surface de cellules cancéreuses.

Le récepteur aux chimiokines le plus fréquemment détecté dans les cellules cancéreuses est le CXCR4. Son expression est retrouvée dans plus d'une vingtaine de type de cancers différents dont les tumeurs de la vessie, de la prostate, du poumon, du foie et du cerveau (Chatterjee *et al.*, 2014 ; Saint *et al.*, 2011). Il est aujourd'hui proposé que ces cellules tumorales puissent détourner l'axe CXCR4/SDF-1 afin d'activer les processus invasifs. Le fait que l'expression de SDF-1 soit particulièrement élevée dans les sites de métastases fréquents, comme le cerveau, la moelle osseuse et le poumon, vient appuyer cette hypothèse (Chatterjee *et al.*, 2014). Plusieurs études ont démontré que les fibroblastes associés aux cancers peuvent produire du SDF-1, et stimuler ainsi la migration de cellules cancéreuses vers le bord invasif de la tumeur et vers des vaisseaux sanguins (Eck *et al.*, 2009 ; Orimo *et al.*, 2005). Dans le cadre des tumeurs gliales, Sehgal et collaborateurs ont déterminé que le CXCR4 était surexprimé dans 57% des glioblastomes multiformes primaires et dans 88% des lignées de glioblastomes analysées (Sehgal *et al.*, 1998). L'expression du CXCR4 et de son

ligand peut varier d'un gliome à l'autre mais, d'une manière générale, semble augmenter avec le grade de la tumeur (Gagliardi *et al.*, 2014). Les tumeurs satellites ainsi que les bords invasifs des glioblastomes sont également des régions où l'expression du CXCR4 est la plus élevée (Zagzag *et al.*, 2008). Ainsi, la présence du RCPG dans les glioblastomes est généralement un marqueur de mauvais pronostic et un indicateur d'une espérance de vie post-opératoire relativement faible.

Le système urotensinergique fait également parti des couples RCPG/ligand potentiellement impliqués dans la progression tumorale. L'une des premières études suggérant un rôle du système urotensinergique dans le développement tumoral avait permis de démontrer une forte expression de l'UII et l'UT dans des carcinomes rénaux (Shenouda *et al.*, 2002). Cette hypothèse a par la suite été renforcée par des travaux reliant le système urotensinergique à d'autres types de cancers. Franco et collaborateurs ont récemment mis en évidence une expression accrue de l'UT dans les formes les plus invasives des tumeurs musculaires de la vessie. De plus, la motilité et le pouvoir invasif des cellules issues de ces tumeurs peuvent être bloqués par des ARN interférents dirigés contre l'UT, ou par un antagoniste du récepteur (Franco *et al.*, 2014). Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules issues de tumeurs prostatiques (Grieco *et al.*, 2011) et colorectales (Federico *et al.*, 2014). Notre équipe a également démontré des effets pro-migratoire de l'UT sur des cellules cancéreuses, cette fois dans le contexte de glioblastome (Lecointre *et al.*, 2015). En dépit d'une origine tissulaire variable, ces cancers ont la particularité d'être particulièrement agressifs et métastatiques. Le système urotensinergique pourrait donc participer directement à la dissémination des cellules cancéreuses.

Chapitre II : L'autophagie

1. Historique

Le terme « autophagie » provient du grec « auto » voulant dire soi-même et « phago » signifiant manger. Il s'agit d'un processus catabolique, hautement conservé chez les cellules eucaryotes, au cours duquel du matériel cytoplasmique est capturé dans des vésicules, puis livré aux lysosomes pour y être dégradé. De cette manière, l'autophagie participe au maintien de l'homéostasie cellulaire. Lorsque le phénomène a été observé pour la première fois, dans les années 50, l'idée qu'une cellule doive « s'auto-digérer » était surprenante. L'hypothèse la plus simple était que l'autophagie permettait de dégrader des protéines mal repliées, des organites endommagés ou des agents infectieux. Nous savons aujourd'hui que sa fonction est plus complexe puisqu'il s'agit également d'une réponse adaptative, qui fournira de l'énergie pour faire face à différents types de stress. De plus, l'avancée des travaux au cours de ces dernières années a révélé qu'il ne s'agissait pas que d'une dégradation aléatoire de substrats, mais qu'il existe des mécanismes permettant de sélectionner les cargos à éliminer. La découverte de ces mécanismes a permis de connecter l'autophagie à la physiopathologie humaine, dans des contextes tels que le vieillissement, le cancer, la réponse immunitaire ou encore la neurodégénérescence.

Il y a près de soixante ans, Clark et Novikoff ont été les premiers à décrire des vésicules denses contenant des mitochondries en cours de dégradation, sur des coupes de reins de souris et de rats (Clark, 1957 ; Novikoff, 1959). Novikoff et Essner ont plus tard détecté la présence d'enzymes lysosomiales au sein de ces structures (Novikoff & Essner, 1962). C'est en 1963, lors d'un symposium sur les lysosomes organisé par la Fondation Ciba, que le terme « autophagie » fut utilisé pour la première fois pour décrire des vésicules à simple ou double membrane, contenant du matériel cytoplasmique en cours de dégradation. Le mot fut employé par le cytologiste belge Christian de Duve, qui avait auparavant découvert l'existence du lysosome et du peroxysome. Par la suite, les premières études s'intéressant à la régulation de l'autophagie ont commencé à apparaitre. Des observations faites sur des foies de rats ont démontré que l'activité autophagique était plus intense chez des animaux privés de nourriture (Novikoff *et al.*, 1964). Il a par ailleurs été démontré que le glucagon stimulait l'autophagie dans le foie de rat (Deter *et al.*, 2016), alors que l'insuline l'inhibait (Pfeifer, 1977). Enfin, les acides aminés, qui sont les produits de la dégradation autophagique, peuvent également

l'inhiber (Mortimore & Schworer, 1977). Jusqu'alors, la caractérisation du processus autophagique se basait essentiellement sur des analyses morphologiques, qui avaient permis d'observer les constituants tardifs de l'autophagie, à savoir l'autophagosome, juste avant ou après sa fusion avec le lysosome. Au cours des années 80, l'utilisation de sondes radioactives par l'équipe du Dr Senglen a mené à l'identification du phagophore, constituant précoce de la formation de l'autophagosome (Gordon & Seglen, 1988). Ce n'est qu'à partir des années 90 que les acteurs moléculaires de l'autophagie ont pu être identifiés, en commençant par la protéine *autophagy-related 1* (Atg1) chez la levure, en 1997 (Matsuura *et al.*, 1997). Ces études pionnières ont en grande partie été réalisées par l'équipe du Pr Ohsumi, ce qui lui a valu prix le Nobel de physiologie ou médecine en 2016. Le domaine a ainsi été révolutionné par la possibilité de détecter et de manipuler finement le processus autophagique, ainsi que par la découverte de son importance physiopathologique.

2. Les différentes formes d'autophagie

A ce jour, différentes voies autophagiques ont été identifiées, selon le mécanisme par lequel le substrat à dégrader est amené au lysosome. Celles-ci sont la micro-autophagie, l'autophagie médiée par des chaperonnes et la macro-autophagie.

2.1. La micro-autophagie

La micro-autophagie est un processus qui permet la dégradation de matériel cytoplasmique de manière non-spécifique, *via* une séquestration au niveau de la membrane du lysosome ou de la vacuole. Chez la levure, des invaginations tubulaires, appelées « tubes autophagiques », se forment à partir de la membrane vacuolaire. Au bout de ces tubes apparaissent des vésicules qui seront libérées dans la lumière de la vacuole, par scission. La fréquence de formation de ces invaginations dépend du statut nutritionnel de la cellule. Après scission, la vésicule et son contenu sont dégradés par des hydrolases, puis la perméase Atg22p permet le recyclage des acides aminés, produits de dégradation, vers le cytosol (Li *et al.*, 2012 ; Fig. 12). Par ailleurs, plusieurs sous-types de micro-autophagies sélectives ont également été décrits chez la levure. Nous pouvons citer la micro-mitophagie, qui correspond à la séquestration sélective de mitochondries par la vacuole, ou encore la micro-nucléophagie, où des portions de noyau sont dégradées suite à la formation de jonctions entre les membranes vacuolaire et nucléaire (Mijaljica *et al.*, 2011).

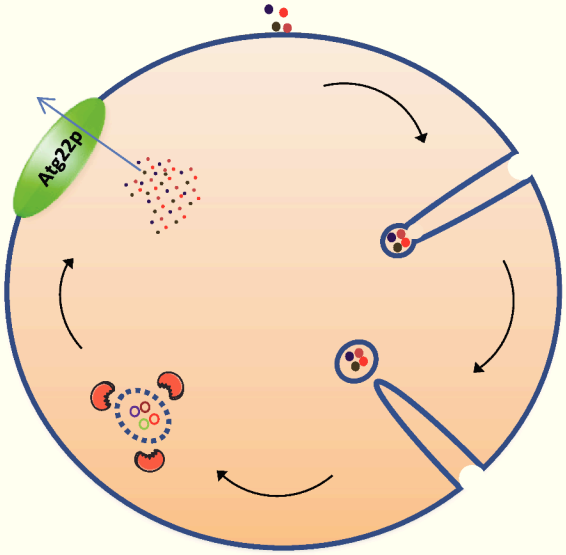


Figure 12 : La micro-autophagie. En réponse à un stress nutritionnel, des invaginations se forment à partir de la membrane vacuolaire, au bout desquelles apparaissent des vésicules. Celles-ci sont libérées dans la lumière de la vacuole et sont dégradées avec leur contenu par des hydrolases. La perméase Atg22p permet ensuite l'efflux d'acides aminés vers le cytosol.

Bien que le processus micro-autophagique ait principalement été décrits chez la levure, des phénomènes similaires ont également été observés dans des cellules de mammifères. Deux cas de figure sont alors possibles : *i)* des protrusions peuvent émaner de la membrane lysosomiale pour entourer une portion de cytoplasme, et donc former de larges vésicules intra-lysosomiales (de Waal *et al.*, 1986 ; Marzella *et al.*, 1980) *ii)* le lysosome tout entier peut s'allonger pour englober le cargo (Sakai *et al.*, 1989). Malheureusement, le nombre de techniques actuellement disponibles pour évaluer la micro-autophagie dans les cellules de mammifère est relativement limité. L'essentiel des observations a été réalisé par microscopie électronique, ce qui rend difficile la compréhension des mécanismes régissant le phénomène.

2.2. L'autophagie médiée par les chaperonnes

Contrairement à la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (ou CMA : *chaperone-mediated autophagy*) est exclusivement sélective. Les substrats protéiques sont reconnus, puis transportés vers la lumière du lysosome *via* l'action coordonnée de chaperonnes, localisées des deux côtés de la membrane. Le ciblage des protéines se fait grâce à un motif pentapeptidique. Celui-ci serait basé sur les propriétés physiques des acides aminés, plutôt que sur une séquence bien spécifique. Ainsi, cette séquence peut varier d'une protéine à l'autre, mais il s'agit toujours d'une combinaison de charges positives, négatives, d'acides aminés hydrophobes, et d'un résidu glutamine à l'une des extrémités (Dice, 1990). Il a été démontré que l'ajout du pentapeptide est suffisant pour induire la translocation de protéines vers le lysosome. Cette stratégie a d'ailleurs récemment été utilisée afin de développer un traceur fluorescent de la CMA (Koga *et al.*, 2011). Contrairement à d'autres marqueurs, tels que l'ubiquitine, qui sont ajoutés au moment de la dégradation, le motif de

ciblage pour la CMA est toujours présent dans la séquence du substrat. Ceci soulève la question du mode de régulation de ce processus. Il est possible que l'exposition du motif soit favorisée par un dépliement partiel de la protéine, sa dissociation d'un complexe ou d'une membrane cellulaire. Le motif de ciblage est reconnu par une chaperonne cytosolique, la protéine *heat shock cognate protein of 70kDa* (hsc70) (Chiang *et al.*, 1989). La protéine cible est alors acheminée vers la membrane du lysosome, où le complexe substrat-hsc70 se lie à la queue cytosolique de la protéine *lysosome-associated membrane protein type 2A* (LAMP-2A) (Maria *et al.*, 1996). Il s'agit d'une protéine transmembranaire présente sous forme de monomère. Sa liaison au substrat stimule sa multimérisation en un complexe d'environ 700kDa, requis pour la translocation du substrat vers la lumière du lysosome (Fig. 13). La stabilité de ce complexe est maintenue grâce à une forme lysosomilale de hsc-70. Il est à noter que les taux de LAMP-2A présents à la membrane du lysosome sont déterminants pour la CMA. Ces taux peuvent diminuer suite au clivage et à la dégradation du fragment intralysosomial de LAMP-2A, ou augmenter par néo-synthèse et intégration des nouvelles molécules dans la membrane. Il a été démontré que la fixation d'un substrat peut à la fois inhiber la dégradation de LAMP-2A et stimuler son intégration dans la membrane (Cuervo & Dice, 2000).

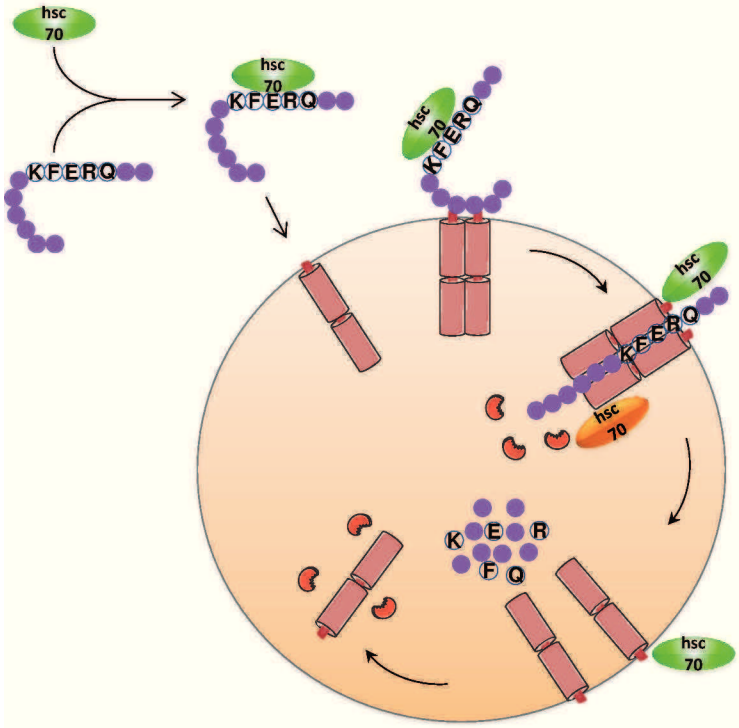


Figure 13 : L'autophagie médiée par des chaperonnes : Le motif pentapeptidique (KFERQ) est reconnu par la chaperonne hsc70 cytosolique. Le complexe est alors acheminé vers la membrane lysosomiale et se fixe à la queue cytoplasmique de LAMP-2A. Ceci provoque la multimérisation de LAMP-2A et le recrutement d'une hsc70 lysosomiale participant au maintien de la stabilité du complexe. Le substrat protéique est transloqué vers la lumière du lysosome pour y être dégradé par des hydrolases. Le complexe LAMP-2A est ensuite dissocié. En absence de subtrat, LAMP-2A peut être internalisé et lui-même dégradé par les hydrolases lysosomiales.

Parmi les substrats caractérisés de la CMA, plusieurs appartiennent à la famille des facteurs de transcription ou de leurs inhibiteurs. C'est par exemple le cas d'IκB, un inhibiteur du facteur de transcription NF-κB. En cas de déprivation prolongée en nutriments, l'IκB est dégradé par la CMA, permettant ainsi à NF-κB d'activer les programmes transcriptionnels nécessaires à l'adaptation à ce stress (Cuervo *et al.*, 1998).

2.3. La macro-autophagie

La macro-autophagie est le mécanisme autophagique le plus étudié. De larges portions de cytoplasme sont séquestrées au sein de vésicules à double membrane appelées autophagosomes. Ces derniers fusionnent ensuite avec les lysosomes, où différents types d'hydrolases permettent la dégradation des protéines, sucres et lipides complexes que contenait l'autophagosome. Les diverses étapes de ce processus seront détaillées dans le paragraphe suivant. Outre son aspect non sélectif, les travaux menés au cours de ces dernières années ont démontré que certains organites pouvaient aussi être spécifiquement dégradés par macro-autophagie. Nous savons aujourd'hui que, selon le type de stress induit, les autophagosomes peuvent séquestrer et dégrader des agrégats protéiques, du réticulum endoplasmique (RE) ou encore des mitochondries. Nous parlerons alors respectivement d'agrégaphagie, de réticulophagie et de mitophagie (Van Der Vaart *et al.*, 2008).

3. La machinerie autophagique

Le processus de macro-autophagie (appelée autophagie par la suite) peut être divisé en plusieurs étapes successives : l'initiation, la nucléation, l'élongation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. L'initiation consiste en la transmission d'un signal, sous la forme de complexes initiateurs, vers la membrane du RE, où se déroulera la nucléation de la membrane d'isolation, également appelée phagophore. Le phagophore va alors s'allonger en s'incurvant autour de matériel cytoplasmique qu'il séquestre en son centre, puis se refermer sur lui-même, formant ainsi une vésicule entourée par deux membranes, nommée autophagosome. Ce processus se déroule rapidement. Il est estimé que la formation d'un autophagosome peut prendre moins d'une dizaine de minutes dans les cellules de mammifères (Mizushima *et al.*, 2001). L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome pour donner l'autolysosome, où son contenu est dégradé par l'action d'hydrolases lysosomiales (Fig. 14). Les produits de cette hydrolyse sont ensuite transférés vers le cytoplasme pour y être réutilisés.

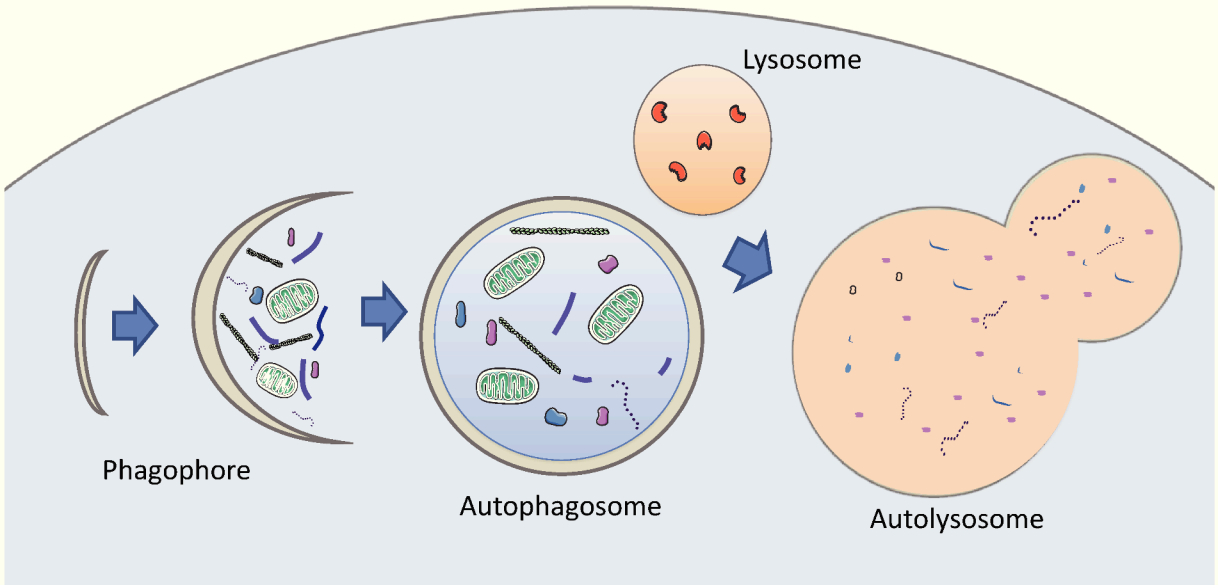


Figure 14 : La macroautophagie. La première étape de la macroautophagie est la formation d'une structure multimembranaire appelée phagophore. Celui-ci s'allonge en englobant du matériel cytoplasmique puis se referme pour former un autophagosome. Par sa fusion avec le lysosome, il devient l'autolysosome, dont le contenu est dégradé par les enzymes lysosomiales.

Bien que les premières études sur l'autophagie datent des années 50, la machinerie moléculaire régissant ce processus est encore sujet à débat. Le modèle actuel propose qu'un certain nombre de protéines appelées Atg orchestrent la construction de l'autophagosome en étant recrutées à la membrane du phagophore de manière hiérarchique. A ce jour, plus de 30 protéines Atg ont été identifiées chez la levure. Parmi celles-ci, une quinzaine, hautement conservées chez les mammifères, sont essentielles à l'autophagie induite par la déplétion de nutriments, ainsi qu'à l'autophagie sélective (Nakatogawa *et al.*, 2009).

3.1. Initiation de l'autophagie

Deux complexes participent à l'initiation de l'autophagie : le complexe ULK (*Uncoordinated 51-like Ser/Thr kinase*) et le complexe PI3K-III (phosphoinositide 3-Kinase de classe III) (Itakura & Mizushima, 2010).

Le complexe ULK est composé des kinases ULK1 ou ULK2, d'Atg13 et de la protéine FIP200 (*Focal adhesion kinase-family interacting protein of 200 kDa*) (Ganley *et al.*, 2009). ULK1 et ULK2 sont les orthologues d'Atg1 chez la levure. Le rôle exact d'ULK1 *versus* ULK2 n'est cependant pas clairement défini. Il est possible qu'une certaine redondance existe entre ces deux isoformes. Bien que ces deux protéines se localisent au site d'initiation de l'autophagie, des études d'ARN interférence menées dans des cellules HEK-293 ont démontré

que seul ULK1 est indispensable à la formation d'autophagosomes, induite par une carence en acides aminés (Chan *et al.*, 2007). Les protéines FIP200 et Atg13 sont, quant à elles, essentielles à la relocalisation d'ULK1, du cytosol vers le site d'initiation, ainsi qu'à l'activité maximale de la kinase (Ganley *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été démontré que les domaines carboxy-terminaux d'ULK1 et d'ULK2 peuvent se lier aux membranes. Cette propriété pourrait alors contribuer au recrutement du complexe vers le site d'initiation de l'autophagosome (Chan *et al.*, 2009).

L'activité du complexe ULK dépend également de son degré de phosphorylation. Une trentaine de sites de phosphorylation ont été identifiés sur la protéine ULK1, bien que, pour la majorité d'entre, leur fonction, ainsi que la kinase impliquée, n'aient pas encore été identifiées (Hildegard *et al.*, 2012). Nous savons néanmoins qu'ULK1 est sensible aux signaux provenant du complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) et de la kinase AMPK (*5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*), qui détectent le statut énergétique de la cellule, et le traduisent alors en modulant l'activité autophagique (Wong *et al.*, 2013 ; Fig. 15). Le complexe mTORC1 est composé de la sérine/thréonine kinase mTOR, de RAPTOR (*regulotory associated protein of mTOR*) et de la protéine mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*). En milieu riche, ce complexe est capable d'interagir, *via* RAPTOR, avec ULK1. Cette interaction crée une séparation physique entre ULK1 et ses substrats, l'empêchant d'exercer son activité pro-autophagique. Lors d'une carence nutritionnelle ou suite à l'inhibition pharmacologique de mTOR par la rapamycine, le complexe ULK est déphosphorylé et se dissocie de mTORC1 (Hosokawa *et al.*, 2009). Il peut alors rejoindre le site de nucléation et assurer le recrutement des protéines Atg. L'AMPK est, quant à elle, régulée par les concentrations d'adénosine monophosphate (AMP), et est ainsi sensible au statut énergétique de la cellule. L'action de cette kinase est double : *i)* contrairement à mTOR, l'AMPK peut activer ULK1 par phosphorylation (Kim *et al.*, 2011) *ii)* la phosphorylation de RAPTOR par l'AMPK inhibe mTORC1 et permet ainsi d'induire l'autophagie (Gwinn *et al.*, 2008 ; Fig. 15).

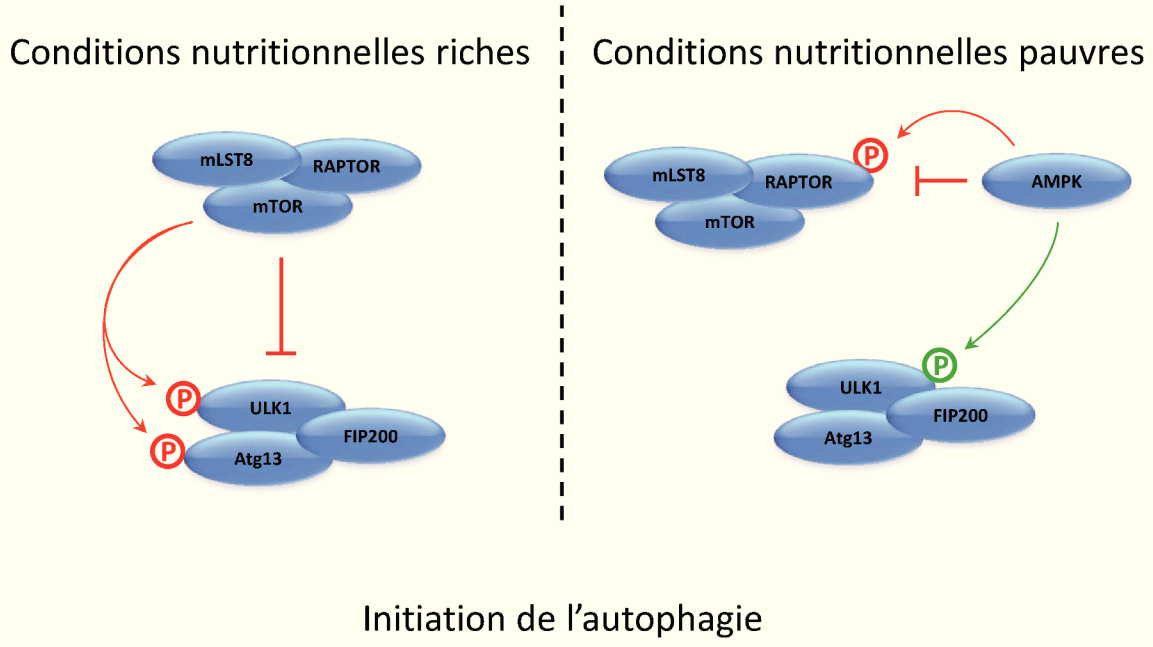


Figure 15 : Régulation du complexe ULK. En conditions physiologiques, le complexe ULK est inhibé par la phosphorylation des protéines ULK1 et Atg13 par mTORC1. Lors d'une carence nutritionnelle, l'AMPK peut lever cette inhibition en bloquant l'activité de mTORC1 *via* une phosphorylation de RAPTOR. L'AMPK peut également phosphoryler ULK1, afin de stimuler son activité. Le complexe ULK peut alors rejoindre le site d'initiation de la formation du phagophore.

Le second complexe participant à l'initiation de l'autophagie, PI3K-III, est composé des protéines Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), p150 et Beclin-1. L'activité catalytique du complexe est portée par Vps34. La protéine p150 joue un rôle régulateur ; sa liaison à Vps34 augmente la stabilité et l'activité de la kinase. Beclin-1 quant à elle, sert d'échafaudage en permettant le recrutement de régulateurs orientant la fonction du complexe PI3K-III vers le processus autophagique ou le trafic vésiculaire (Backer, 2008; McKnight & Zhenyu, 2014; Panaretou *et al.*, 1997). L'activité lipide kinase du complexe PI3K-III permet la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) au niveau de sous-domaines de la membrane du RE qui, comme nous le détaillerons plus tard, est essentielle à la nucléation du phagophore (Axe *et al.*, 2008). L'une des approches pharmacologiques les plus communément utilisées pour entraver l'autophagie repose d'ailleurs sur des inhibiteurs de la PI3K-III, la wortmannin, le 3-méthyladénine ou le LY294002 (Mizushima *et al.*, 2010).

La protéine adaptatrice Beclin-1 contient trois domaines importants: un domaine BH3 (*Bcl-2 homology 3*), un domaine CCD (*coiled-coil domain*) et un domaine

ECD (*evolutionarily conserved domain* ; McKnight & Zhenyu, 2014). *Via* son domaine CCD, la protéine Beclin-1 peut se lier à des partenaires différents, et ces liaisons offrent des fonctions variées au complexe PI3K-III résultant. Parmi ces partenaires, les protéines Atg14L, UVRAG (*UV irradiation resistance-associated gene*) et AMBRA1 (*activating molecule in Beclin-1-related autophagy*) exercent des effets pro-autophagiques en favorisant l'activité du complexe PI3K-III. Il semblerait que la compétition Beclin1-Atg14L *versus* Beclin1-AMBRA1 mène à la formation de deux complexes mutuellement exclusifs. L'Atg14 possède un domaine de ciblage vers le RE, ce qui favoriserait son recrutement au site d'initiation. Bien qu'UVRAG soit capable d'augmenter l'activité enzymatique de la PI3K-III, et de cette manière, d'induire la formation d'autophagosomes (Liang *et al*., 2006), son rôle dans l'initiation de l'autophagie reste encore mal compris, puisque les complexes PI3K-III contenant UVRAG ne semblent pas se localiser au niveau de site d'initiation, mais au niveau des endosomes tardifs Rab9-positifs (Itakura *et al*., 2008). Il est à noter qu'en plus d'initier l'autophagie, les protéines Atg14L et UVRAG contribueraient aussi aux phénomènes de maturation de l'autophagosome, en participant à sa fusion avec les endosomes (Fan *et al.*, 2011) (Liang *et al*., 2008).

Un certain nombre de protéines anti-autophagiques peuvent également se lier à la Beclin-1. En interagissant avec le domaine BH3 de la Beclin-1, Bcl-2 et Bcl-xL peuvent inhiber sa liaison à Vps34, réprimant alors l'activité du complexe PI3K-III (Maiuri *et al*., 2007; Pattingre & Levine, 2006). Enfin la protéine RUBICON (*RUN domain protein as Beclin-1 interacting cystein-rich containing*) exerce un effet négatif sur la biogenèse des autophagosomes en se fixant à la Beclin-1, plus particulièrement à la sous-population des complexe PI3K-III contenant UVRAG (Matsunaga *et al*., 2009 ; Fig. 16). De façon intéressante, l'étape d'initiation de l'autophagie nécessite l'activation séquentielle des complexes ULK et PI3K-III. Cela est permis par la phosphorylation et l'activation directe de Beclin-1 par le complexe ULK (Russell *et al*., 2013).

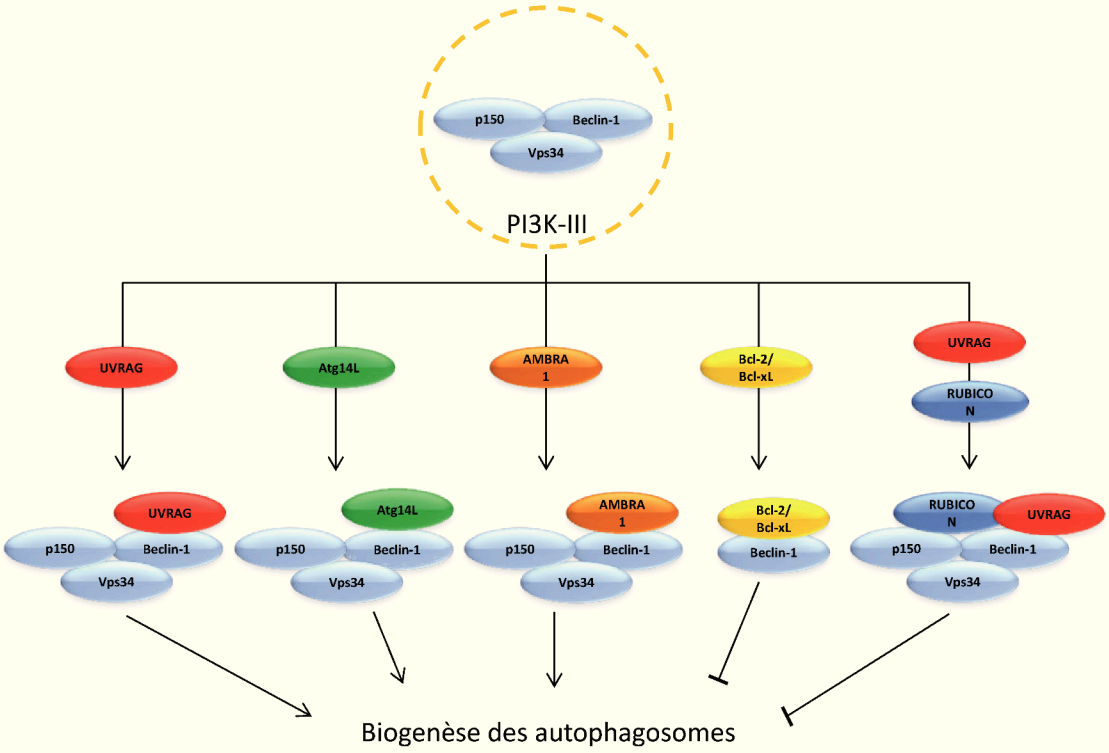


Figure 16 : Régulation de l'activité PI3K-III par les partenaires de la Beclin-1. Le complexe PI3K-III a pour rôle de former du PI3P à la surface de la membrane d'isolation, qui permettra d'initier la biogenèse des autophagosomes. Le cœur de ce complexe est composé des protéines p150, Vps34 et Beclin-1. Cette dernière peut se lier à différents partenaires qui moduleront alors l'activité et/ou la localisation du complexe PI3K-III. Ainsi, les protéines UVRAG, Atg14L et AMBRA1 stimulent l'activité du complexe, alors que les protéines Bc2-2/Bcl-xL et RUBICON peuvent l'inhiber.

3.2. La nucléation et l'élongation du phagophore

La seconde étape de la biogenèse de l'autophagosome est la nucléation du phagophore, permise par le complexe PI3K-III, qui synthétise du PI3P au niveau de sous-domaines du RE. Ces sous-domaines, enrichis en PI3P, constituent alors une véritable plateforme permettant le recrutement séquentiel de différentes protéines autophagiques (Axe *et al.*, 2008). Les protéines DFCP1 (*Double FYVE domain containing protein 1*), WIPI1 (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides 1*) et WIPI2, capables de lier le PI3P, sont les premières à se relocaliser au site de nucléation du phagophore (Grimmel *et al.*, 2015 ; Proikas-Cezanne *et al.*, 2015). Elles permettent, à leur tour, le recrutement d'autres protéines Atg, telles que l'Atg9, le complexe ternaire Atg5-Atg12-Atg16L1 et la protéine LC3 conjuguée au phosphatidyléthanolamine (PE), qui contrôlent l'élongation du phagophore.

La synthèse du complexe ternaire Atg5-Atg12-Atg16L1 et de la LC3-PE nécessite deux systèmes de conjugaison, appelés « *ubiquitination-like* », de par les similitudes qu'ils partagent avec le système d'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation par le protéasome. Le système d'ubiquitination nécessite trois familles d'enzymes, appelées E1, E2 et E3-ligases, qui en agissant successivement, permettent une cascade de transferts de l'ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine cible. Dans le contexte de l'autophagie, un mécanisme de transferts en cascade, non pas d'ubiquitine mais des protéines Atg5 et LC3 a été observé.

Synthèse du complexe ternaire Atg5-Atg12-Atg16L1

Le premier système de conjugaison fait intervenir les protéines Atg7 et Atg10. Elles jouent le rôle des E1 et E2 ligases, respectivement, et catalysent la conjugaison de la glycine en position C-terminale de l'Atg12 sur le résidu lysine-130 de l'Atg5. Il s'agit d'une liaison isopeptidique, qui est constitutive et irréversible (Mizushima *et al*., 1998 ; Mizushima et al., 1998). La protéine Atg16L1 est capable de se lier au complexe Atg5-Atg12, et dans une moindre mesure à l'Atg5 seule (Mizushima *et al.*, 1999). L'Atg16L1 peut également s'homopolymériser *via* son extrémité N-terminale, permettant alors la formation d'un complexe multimérique d'environ 800 kDa, localisé au site de formation de l'autophagosome. (Mizushima *et al*., 2003). Il a été démontré que le site de liaison aux membranes est porté par l'Atg5. La présence d'Atg12 ne semble pas être indispensable à l'association de l'Atg5 à l'Atg16L1, ni pour leur ciblage à la membrane d'isolation, mais est tout de même nécessaire à l'expansion du phagophore (Mizushima *et al*., 2003, 1999 ; Romanov *et al*., 2012). Le complexe Atg5-Atg12-Atg16L décore donc la membrane du phagophore et se dissocie de celle-ci lorsque l'autophagosome est formé (Mizushima *et al*., 2003). A ce jour, aucune ligase E3-*like* n'a été identifiée dans le système de conjugaison Atg5/Atg12. En revanche, ce complexe joue lui-même le rôle d'une ligase E3 en participant au processus de lipidation de la protéine LC3 (Hanada *et al*., 2007 ; Fig. 17).

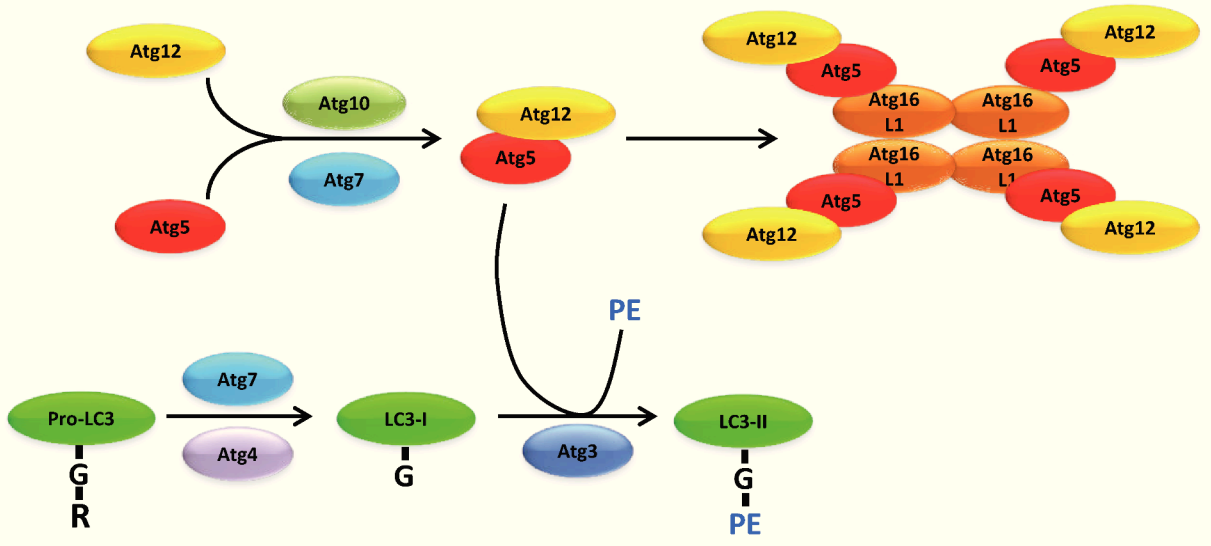


Figure 17 : Les systèmes de conjugaison « *ubiquitination-like* ». Au cours de l'élongation du phagophore, deux systèmes de conjugaison « *ubiquitination-like* » permettent de former le complexe Atg5-Atg12-Atg16L et la LC3-PE. L'Atg10 et l'Atg7 permettent la conjugaison de l'Atg5 à l'Atg12. L'Atg16L peut se lier à l'Atg5, et s'homopolymériser afin de former un complexe de 800 kDa, retrouvé sur le phagophore. Le recrutement de la protéine LC3 nécessite le clivage préalable de son extrémité C-terminale par la protéase Atg4, puis la conjugaison au PE, à cette extrémité, sous l'action des protéines Atg7, Atg3 et Atg5-Atg12.

Synthèse de la LC3-PE

Le second système de conjugaison, impliqué dans l'expansion du phagophore concerne la protéine LC3. La première étape de ce processus est le clivage de l'arginine à l'extrémité C-terminale de la pro-LC3, par la cystéine protéase Atg4, exposant alors une glycine. Celle-ci pourra former une liaison thioester avec l'Atg7. La protéine LC3 est ensuite transférée sur une enzyme de type E2, l'Atg3. La dernière étape est l'ajout d'un groupement PE au niveau du résidu glycine de la LC3 (Hanada *et al.*, 2007 ; Ichimura *et al.*, 2000). Cette réaction permet l'ancrage de la protéine LC3 à la membrane du phagophore, d'où elle participe aux phénomènes d'élongation et de fermeture de cette structure. Des expériences menées dans des solutions de liposomes ont démontré que la présence de la LC3-PE est suffisante pour lier les vésicules entre elles et stimuler l'hémifusion des membranes (Nakatogawa *et al.*, 2007). Contrairement au système de conjugaison Atg5/Atg12, la réaction de lipidation de la LC3 est réversible. Lors de la fermeture de l'autophagosome, la cystéine protéase Atg4 peut cliver une fraction des molécules LC3-PE localisée sur la membrane externe du phagophore (Kirisako *et al.*, 2000). Une partie des protéines LC3 restera liée à l'autophagosome, et sera donc dégradée

au moment de la fusion autophagosome-lysosome. Ceci fait de la protéine LC3 un marqueur de choix, couramment utilisé pour évaluer la biogenèse et la localisation des autophagosomes (Mizushima *et al*., 2010).

3.3. Elongation du phagophore : les différentes sources de membranes

L'origine des membranes impliquées dans la construction de l'autophagosome est un sujet encore très controversé (Juhasz & Neufeld, 2006). Le RE a longtemps été considéré comme une source majoritaire de phospholipides dans ce processus. Toutefois l'introduction récente de techniques d'imagerie sophistiquées et d'outils moléculaires spécifiques à l'autophagie a permis d'identifier d'autres compartiments cellulaires (appareil de Golgi, mitochondries, endosomes de recyclage, membrane plasmique) contribuant significativement à l'expansion du phagophore. Sur la base de ces travaux, le modèle actuel propose que toutes ces sources ne seraient pas mutuellement exclusives, mais « se rejoindraient » afin de construire conjointement l'autophagosome (Abada & Elazar, 2014 ; Fig. 18).

Une source golgienne

L'implication de l'appareil de Golgi a essentiellement été mise en évidence à travers la détection de la protéine Atg9. Alors que la plupart des protéines Atg sont cytosoliques et s'associent de manière transitoire avec d'autres Atg et/ou des membranes, l'Atg9 est la seule protéine autophagique à être intégrée aux membranes cellulaires (Young *et al*., 2006). Elle possède en effet six domaines transmembranaires, et ses extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques. En conditions basales, la protéine se localise dans les compartiments trans-golgien et endosomal. Suite à une déprivation de nutriments, la protéine Atg9 est transférée au niveau de la membrane du phagophore, et ceci de manière ULK1-dépendante (Mari *et al*., 2010 ; Young *et al*., 2006). Etant donné la nature vésiculaire des structures Atg9-positives, le modèle actuel propose que le rôle de l'Atg9 serait de livrer ces vésicules, et donc des phospholipides, au phagophore en cours d'élongation (Lamb *et al*., 2013). De façon intéressante, les travaux d'Orsi et collaborateurs indiquent que l'Atg9 interagit avec le phagophore de manière très transitoire, et n'est pas incorporée dans la membrane de celui-ci. Ces résultats suggèrent donc que l'Atg9 ferait la navette entre un réservoir de membranes et le phagophore afin de permettre son élongation (Orsi *et a*l., 2012).

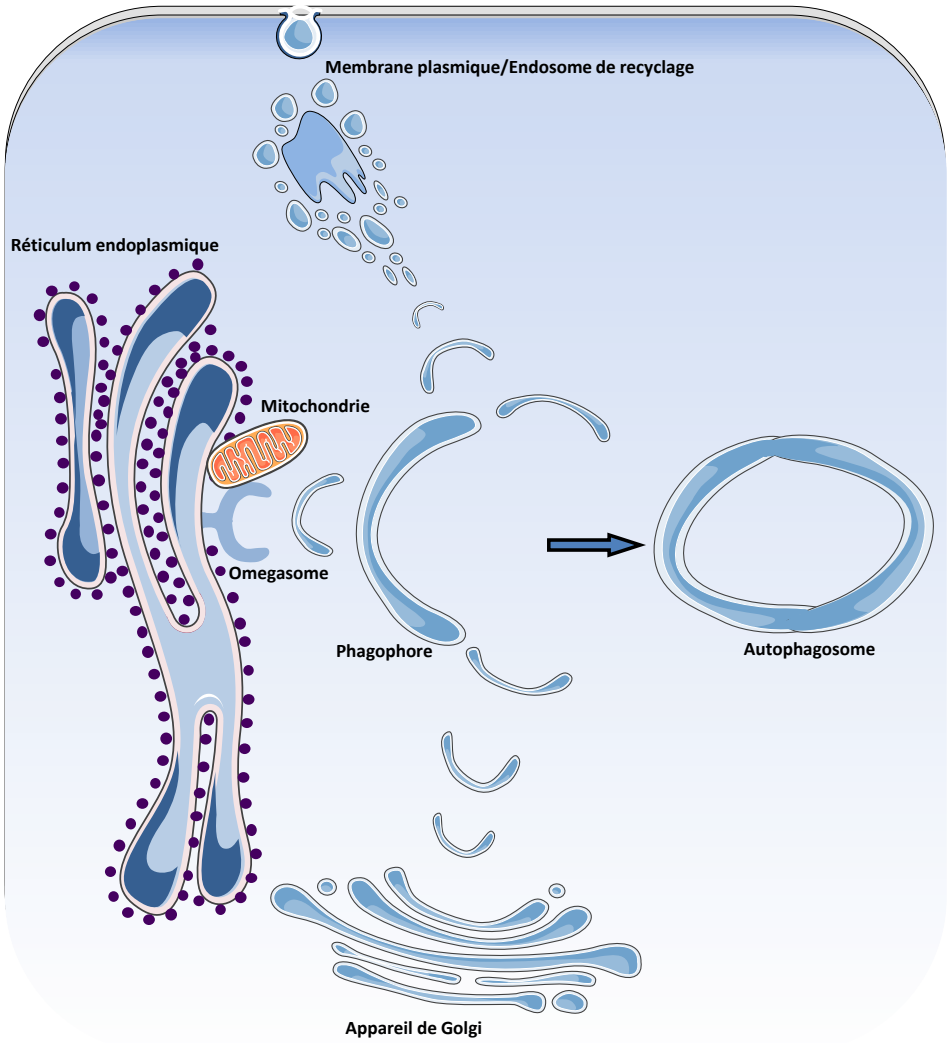


Figure 18 : Les différentes sources de membrane de l'autophagosome. Il est aujourd'hui admis que plusieurs organites sont impliqués dans la construction de l'autophagosome. Le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, l'appareil de Golgi ainsi que la membrane plasmique et les endosomes qui en émanent sont tous considérés comme des sources de membrane contribuant à l'expansion du phagophore.

Une source mitochondriale

Le rôle de la mitochondrie dans la construction de l'autophagosome a également récemment été démontré. Par l'utilisation de marqueurs ciblant spécifiquement les feuillets interne ou externe de la membrane mitochondriale, Hailey et collaborateurs ont démontré que des portions de membrane provenant du feuillet externe étaient présentes sur près de 80 % des autophagosomes. De plus, une perturbation des points de contact entre le RE et la mitochondrie, par la perte des protéines mytofusine 2 ou *phosphofurin acidic cluster sorting protein-2* (PACS2), inhibe le recrutement d'Atg14L ou de la LC3 induit par un stress

nutritionnel (Hailey *et al.*, 2010 ; Hamasaki *et al.*, 2013). Les résultats de ces études suggèrent que la membrane mitochondriale contribue à la biogenèse de l'autophagosome, et que plus encore, cette biogenèse aurait lieu aux points de contact entre le RE et la mitochondrie.

Une source endosomale et plasmique

L'implication des endosomes de recyclage dans la formation des autophagosomes a récemment été proposée par deux laboratoires indépendants, recherchant un lien entre l'autophagie et des acteurs du trafic intracellulaire. Les travaux de Knævelsrud *et al.* ont démontré que la protéine SNX18 était nécessaire à la biogénèse des autophagosomes. En liant le PIP_2, au niveau du compartiment périnucléaire de recyclage, la protéine SNX18 peut créer des tubules contenant les protéines Atg16L1 et LC3. Il a d'ailleurs été démontré que SNX18 pouvait directement interagir avec les formes solubles et lipidées de la LC3, suggérant que la lipidation pourrait se faire au niveau de ces tubules. Des vésicules Atg16L1-LC3-positives, émanant de ces tubules sont alors adressées vers le phagophore afin de favoriser son expansion (Knævelsrud *et al.*, 2013). L'équipe du Dr Sharon Tooze a également démontré qu'un flux de membrane provenant du compartiment périnucléaire recyclage pouvait alimenter le phagophore suite à une déplétion en nutriments. Ce flux peut être inhibé par la surexpression d'une protéine appelée TBC1D14 (*Tre-2, Bub2p and Cdc16p 1 domain family member 14*), capable de lier Rab11. De façon intéressante, la protéine TBC1D14 engendre également la formation de tubules au niveau des endosomes de recyclage, mais cette fois en direction de la membrane plasmique, au détriment du phagophore (Longatti *et al.*, 2012). Ces données indiquent que les protéines SNX18 et TBC1D14 pourraient avoir des effets opposés sur le devenir de la membrane provenant du compartiment de recyclage, et constitueraient ainsi un « mécanisme de tri » régulant la synthèse des autophagosomes.

Il a été récemment démontré que la membrane plasmique, par la production de vésicules d'endocytose se dirigeant vers le compartiment périnucléaire de recyclage, pouvait constituer une importante source de membrane pour la biogenèse des autophagosomes. Cette hypothèse est particulièrement séduisante puisque la membrane plasmique constitue un large réservoir de phospholipides, qui pourrait fournir assez de matériel pour une synthèse intense d'autophagosomes sans compromettre d'autres processus cellulaires. Ces vésicules d'endocytose peuvent se former, à la membrane plasmique, par différents mécanismes. Le groupe mené par le Dr David Rubinsztein a démontré la présence de la protéine Atg16L1 à la membrane plasmique, et plus précisément au niveau de vésicules d'endocytose recouvertes

d'un manteau de clathrine. L'Atg16L1 interagirait directement avec la chaine lourde de la clathrine, et serait ainsi endocytée avec celle-ci pour former des précurseurs appelés endosomes pré-autophagiques. L'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante à l'aide d'ARN interférents dirigés contre la chaine lourde de la clathrine ou contre la protéine adaptatrice AP-2 réduit à la fois le nombre d'endosomes pré-autophagiques et le nombre d'autophagosomes matures (Ravikumar *et al*., 2010). Une fois formés, ces endosomes pré-autophagiques doivent fusionner entre eux, puisque l'augmentation de leur taille, résultant de cette fusion, est nécessaire au recrutement de la protéine LC3 et la formation d'autophagosomes matures. Ces fusions homotypiques dépendent de la protéine SNARE VAMP7 et de ses partenaires d'interaction : la syntaxine 7, la syntaxine 8 et la protéine *vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B* (Vtib1b). Les auteurs proposent que VAMP7 pourrait également provenir de la membrane plasmique et serait endocytée en même temps que l'Atg16L1 (Moreau *et al*., 2011). De façon similaire à l'Atg16L1, il a récemment été démontré que l'Atg9 pouvait se localiser dans des vésicules d'endocytose à clathrine. Cependant, il semblerait que ces deux protéines Atg ne soient pas internalisées dans les mêmes structures puisqu'aucune co-localisation n'est observée entre l'Atg9 et l'Atg16L au moment de l'endocytose (Puri *et al*., 2013). Par un processus qui dépend de VAMP3, ces deux protéines coalescent néanmoins dans le compartiment périnucléaire de recyclage, d'où émanent des précurseurs autophagiques alimentant le phagophore. Il est intéressant de noter que bien que les endosomes Atg16L1- et Atg9-positifs se rejoignent dans le compartiment périnucléaire de recyclage, leur trafic intracellulaire est distinct. Les endosomes Atg9-positifs transitent, en effet, *via* le compartiment des endosomes précoces, ce qui n'est pas le cas des endosomes Atg16L1-positifs, qui sont directement ciblés vers le compartiment périnucléaire (Puri *et al*., 2013).

Les travaux de Moreau ont permis d'identifier une deuxième voie d'endocytose, indépendante de la clathrine, qui participe également à la formation des autophagosomes. Cette endocytose dépend de la formation de PIP2 à la membrane plasmique et du recrutement de la protéine *GTPase regulator associated with FAK* (GRAF1), un marqueur marqueur spécifique de la voie d'endocytose clathrine-indépendante nommée *clathrin-independent carriers* (CLIC). L'inhibition de cette voie par la déplétion des niveaux de PIP_2 à la membrane plasmique, ou par l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre GRAF1, réduit le nombre d'autophagosomes matures (Moreau *et al*., 2012 ; Fig. 19).

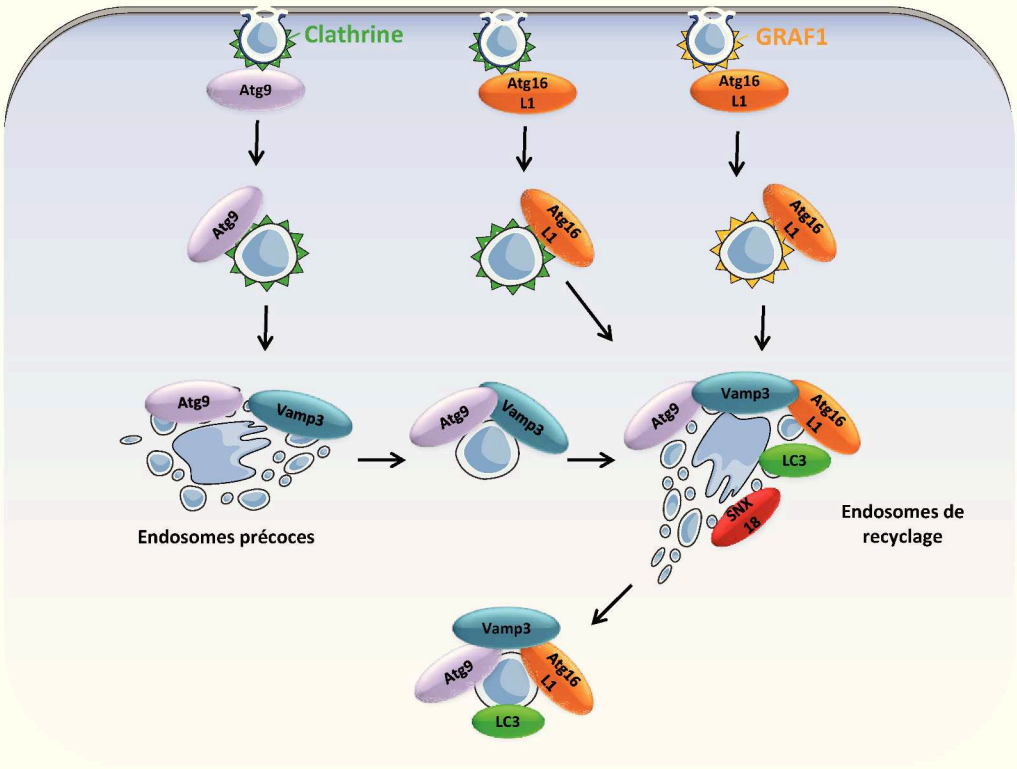


Figure 19 : La formation d'endosomes pré-autophagiques. L'internalisation de l'Atg9 et de l'Atg16L1 se fait à partir de deux populations distinctes de vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine. L'Atg16L1 peut également être internalisée par la voie CLIC, dépendante de GRAF1. Ces différentes vésicules se rejoignent dans le compartiment périnucléaire de recyclage, par un processus qui dépend de VAMP3. De là, émanent les précurseurs autophagiques qui alimenteront le phagophore en cours d'expansion.

3.4. Maturation des autophagosomes et fusion avec les lysosomes

La maturation correspond à la fusion des autophagosomes avec des endosomes et des lysosomes, afin d'acquérir les propriétés requises pour la dégradation de leur contenu. Après leur fermeture, les autophagosomes sont à même de fusionner avec des endosomes précoces ou tardifs, pour donner une vésicule intermédiaire appelée amphisome. Il a été proposé que cette étape soit un prérequis pour la fusion avec le lysosome, puisqu'elle contribuerait à abaisser le pH vers la valeur d'activité optimale des enzymes lysosomiales (Berg *et al.*, 1998). Les autophagosomes vont alors pouvoir se déplacer le long des microtubules grâce aux moteurs protéiques, dynéine/dynactine. Il a été démontré que la LC3 était essentielle lors de cette étape, de par sa capacité à se fixer aux microtubules (Kouno *et al.*, 2005). Ceci permet aux autophagosomes, synthétisés dans l'ensemble du cytoplasme, de se déplacer vers le centrosome, où les lysosomes sont habituellement concentrés (Kimura *et a*l., 2008). La fusion

de l'autophagosome et du lysosome donne naissance à une vésicule à simple membrane appelée autolysosome. Un second type d'interaction peut également avoir lieu. Dans ce scénario, les vésicules ne fusionnent pas complètement, mais une ouverture partielle et transitoire permet un transfert de matériel de l'autophagosome vers le lysosome (Jahreiss *et al*., 2008). Dans les deux cas, l'environnement acide, ainsi que les enzymes hydrolytiques, permettent une dégradation du contenu de l'autophagosome. Les produits de cette dégradation sont ensuite transférés vers le cytoplasme où ils servent à produire de l'énergie ou à synthétiser de nouvelles protéines. Cette étape finale est nécessaire pour mener à bien le processus autophagique. En effet, des agents qui empêchent l'acidification des lysosomes, tels que la chloroquine ou la bafilomycine A1 engendre une accumulation des autophagosomes (Mizushima *et al*., 2010).

4. Modes de régulation de l'autophagie

Les cellules eucaryotes ont développé des réseaux de voies de signalisation qui contrôlent les processus de transcription, de traduction et de modifications post-traductionnelles, dans le but de pouvoir s'adapter à des conditions environnementales changeantes. Faisant partie de la réponse cellulaire à de tels changements, l'autophagie est finement contrôlée par un certain nombre de ces voies de signalisation. Il n'y aucun doute que le processus autophagique, de par sa capacité à dégrader des organites entiers, peut être extrêmement délétère pour la physiologie cellulaire, s'il n'est pas correctement régulé.

4.1. Régulation par les acides aminés

Le mécanisme de régulation de l'autophagie le mieux caractérisé repose sur la détection des taux d'acides aminés environnants. L'absence de certains acides aminés spécifiques tels que la glutamine et la leucine, stimule fortement l'activité autophagique (Seglen *et al*., 1980). Plusieurs mécanismes participent au système de perception de la disponibilité d'acides aminés, et la plupart d'entre eux régulent l'activité autophagique en convergeant vers la protéine kinase mTOR. Comme indiqué précédemment, l'activation de mTOR réprime l'autophagie en inhibant le complexe initiateur ULK (*cf* Partie 3.1). Le groupe mené par le Dr David Sabatini a récemment élucidé l'un des mécanismes d'activation du complexe mTORC1. Les concentrations en acides aminés sont détectées par une famille de quatre GTPases appelées Rag (RagA, RagB, RagC, RagD). Lorsque les conditions sont favorables, celles-ci peuvent se lier au complexe mTORC1, *via* RAPTOR, et ainsi transférer ce complexe

vers la membrane du lysosome (Sancak *et al.*, 2011). En effet, les Rag peuvent aussi s'ancrer à la surface du lysosome grâce à un complexe pentamérique appelé *Ragulator* et à la pompe protéique vacuolaire v-ATPase. Toute cette machinerie permet donc la relocalisation de mTORC1 vers le compartiment lysosomial, où se trouve son activateur, le *RAS homologue enriched in brain* (RHEB). Il a été suggéré que cette localisation lysosomiale de mTOR permettrait également sa régulation par les acides aminés libérés localement, suite à la dégradation des protéines par des enzymes lysosomiales. En cas de carence, les protéines Rag se présentent sous forme d'hétérodimères inactifs et se dissocient de RAPTOR. La séparation physique de RHEB et du complexe mTORC1 mène à l'inhibition de ce dernier, et donc à l'activation de l'autophagie (Sancak *et al*., 2008, 2011; Zoncu *et al.*, 2011 ; Fig. 20).

Le dimère de RCPG *taste receptor type 1 members 1 and 3* (T1R1/T1R3) a initialement été caractérisé dans les neurones gustatifs pour son rôle dans la perception de la saveur umami, grâce à sa capacité à lier le glutamate (Matsunami *et al*., Montmayeur, & Buck, 2000). Nous savons aujourd'hui que ce dimère peut être activé par la plupart des acides aminés, avec des affinités variables, et serait ainsi impliqué dans la détection des taux extracellulaires d'acides aminés. La cascade de signalisation activée par le dimère T1R1/T1R3 permet de stimuler le complexe mTORC1, et donc d'inhiber l'activité autophagique (Fig. 20). Il a été démontré que des ARN interférents dirigés contre T1R3 suffisent à stimuler la formation d'autophagosomes *via* l'inhibition de mTOR (Wauson *et al*., 2012 ; 2014). Enfin, la glutamate déshydrogénase, qui participe à la détection des taux intracellulaires de leucine, peut également bloquer le processus autophagique en augmentant l'activité de mTOR (Lorin *et al*., 2013).

4.2. Régulation par les facteurs de croissance

Etant donné le rôle central de l'autophagie dans le métabolisme cellulaire, il n'est pas surprenant que ce processus puisse également être sous le contrôle de différents facteurs de croissance. Le retrait de ces facteurs du milieu extracellulaire suffit à stimuler l'autophagie malgré la présence de nutriments (Lum *et al*., 2005). Cette augmentation de l'activité autophagique est d'ailleurs indispensable au maintien de la production d'énergie. Il a été récemment démontré que l'activation de l'EGFR pouvait inhiber l'autophagie en stimulant l'activité de mTOR (Fig. 20). L'EGFR peut aussi agir indépendamment de la kinase mTOR, en phosphorylant la Beclin-1 sur plusieurs résidus tyrosines, modifiant alors son interactome. En effet, la Beclin-1 phosphorylée présente une plus forte affinité pour la protéine RUBICON,

et une affinité moindre pour la kinase Vps34. Il en résultera une réduction de l'activité du complexe PI3K-III, et donc de la biogenèse des autophagosomes (Wei *et al.*, 2013).

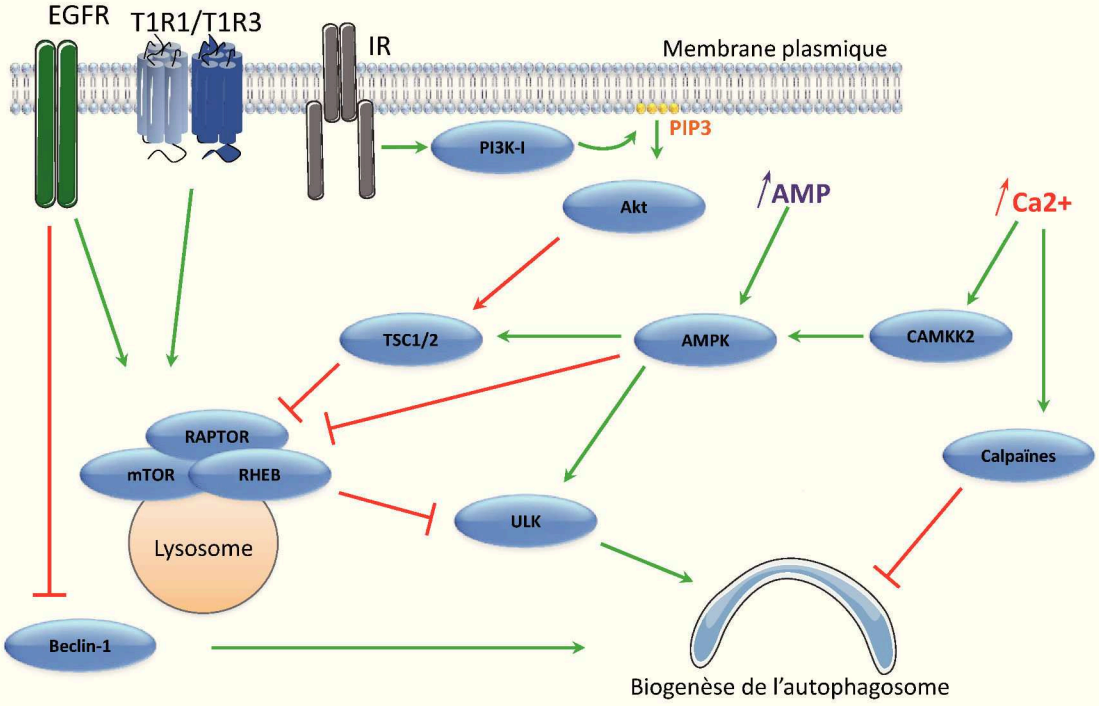


Figure 20 : Modes de régulation de l'autophagie. Lorsque les nutriments sont abondants, la kinase mTOR est activée par RHEB, à la membrane lysosomiale. De là, mTOR peut réguler le métabolisme cellulaire par plusieurs mécanismes, dont l'inhibition de l'autophagie. Lorsque les conditions sont défavorables, l'AMPK peut inhiber le complexe mTORC1 *via* la phosphorylation de RAPTOR ou alors l'activation du complexe TSC1-TSC2, un inhibiteur de mTOR. L'EGFR et le récepteur T1R1/T1R3 peuvent, quant à eux, stimuler l'activité de mTOR. L'EGFR peut également bloquer le processus autophagique *via* l'inhibition de la protéine Beclin-1. L'activation du récepteur à l'insuline engendre la formation de PIP_3 et l'activation de l'Akt qui peut lever l'inhibition de TSC1-TSC2 sur mTOR. Une augmentation des concentrations cytosoliques en calcium, suite à un stress du RE par exemple, peut mener à une augmentation de l'activité autophagique grâce à l'activation de l'AMPK par la kinase CAMMK2. Les calpaïnes sont également sensibles aux niveaux de calcium et pourraient inhiber l'autophagie par le clivage de différentes protéines Atg.

Un rôle de l'insuline et des facteurs de croissance *insulin-like* sur l'activité autophagique a également été caractérisé. L'insuline peut inhiber le processus autophagique *via* une activation du complexe mTORC1. L'activation du récepteur à l'insuline conduit à la production de PIP_3 à la membrane plasmique par PI3K-I. Ceci permet le recrutement et l'activation de la protéine kinase Akt à la membrane plasmique. Cette kinase peut alors lever l'inhibition exercée par le complexe TSC1/2 sur mTORC1, et freine ainsi la biogenèse des

autophagosomes (Alessi *et al*., 1997 ; Sarkar, 2013 ; Stokoe *et al*., 1997). Par ailleurs, le facteur de transcription *forkhead box class O3* (FOXO3) est régulé par Akt. En présence d'insuline ou de facteurs de croissance, la phosphorylation de FOXO3 par Akt séquestre ce facteur de transcription dans le cytosol, *via* une liaison à la protéine 14-3-3. Des études réalisées dans des cellules musculaires murines ont démontré que lorsque la signalisation Akt est inhibée, la protéine FOXO3 peut être transférée dans le noyau, et stimule alors l'expression de plusieurs protéines autophagiques dont LC3, Atg12, Beclin-1, Atg4b, ULK2 et Vps34 (Zhao *et al*., 2007). Contrairement à ce que nous pourrions attendre, l'inhibition de la voie du récepteur *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) est également délétère pour l'autophagie. L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre IGF-1R inhibe le complexe mTORC2, ce qui réduit ensuite l'activité de la protéine kinase C. Ceci perturbe le cytosquelette d'actine et donc les phénomènes d'endocytose qui en dépendent. Il en résulte alors une atténuation de la formation des endosomes pré-autophagiques, nécessaires à la biogenèse des autophagosomes (Renna *et al*., 2013).

4.3 Régulation par l'hypoxie

Des taux d'oxygène inférieurs à 1 % représentent des conditions hypoxiques pour la plupart des types cellulaires de mammifères. Les données de la littérature indiquent que l'hypoxie induit l'autophagie, et plus particulièrement, l'autophagie sélective des mitochondries, appelée mitophagie. Il s'agirait d'une réponse adaptative permettant de débarrasser la cellule des mitochondries endommagées, qui constituent la principale source d'espèces réactives de l'oxygène.

Des travaux antérieurs ont démontré que les protéines BNIP3 et Redd1, induites par l'hypoxie, jouent un rôle essentiel dans l'inhibition de l'autophagie, en interagissant directement avec deux régulateurs de la voie de signalisation de la kinase mTOR. BNIP3 exerce son action en inhibant la petite protéine G RHEB, activatrice directe de mTOR (Li *et al*., 2007), tandis que la protéine Redd1 agit en stimulant l'activité du complexe TSC1/TSC2, inhibiteur de la voie de mTOR (Brugarolas *et al*., 2004).

Les travaux de Bellot *et al*., (2009) ont permis de mettre en lumière une seconde voie, indépendante de mTOR, par laquelle la protéine BNIP3, ainsi que son homologue BNIP3L, régulent l'autophagie. En condition normoxique, la protéine Beclin-1 est séquestrée à la membrane externe des mitochondries par une interaction de faible affinité avec les protéines

Bcl-2 et Bcl-xL. Les protéines BNIP3 et BNIP3L, induites par l'hypoxie, sont également capables d'interagir avec Bcl-2 et Bcl-xL, libérant ainsi la Beclin-1 dans le cytosol. Une fois libérée, la Beclin-1 peut alors induire l'autophagie en interagissant avec le complexe PI3K-III, essentiel à la formation de l'autophagosome.

4.4. Régulation par le calcium

Plusieurs études ont permis de démontrer un rôle du calcium dans la régulation de l'autophagie. Selon le contexte cellulaire, il apparait que l'effet du calcium pourrait être pro- ou anti-autophagique. Une augmentation de la concentration cytosolique de calcium, lors d'un stress du RE par exemple, constitue un signal inducteur de l'autophagie. Cet effet passerait par l'activation de la c*alcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* (CaMKK2), qui va directement phosphoryler et activer l'AMPK (Høyer-Hansen *et al*., 2007). Une seconde voie menant à l'induction de l'autophagie par le calcium a été mise en évidence. Celle-ci serait indépendante de l'AMPK mais permettrait une inhibition de mTOR qui serait partielle mais suffisante pour induire l'autophagie (Grotemeier *et al*., 2010).

Les calpaïnes, des protéases à cystéines cytoplasmiques, dont l'activité est dépendante du calcium, peuvent aussi contrôler l'activité autophagique et pourraient donc constituer un mode de régulation de l'autophagie par le calcium. Les travaux de Demarchi *et al*. (2006), réalisés sur des fibroblastes murins indiquent que lorsque la sous-unité régulatrice calpaïne 4 est manquante, l'activité de biogenèse des autophagosomes est réduite. Néanmoins, des études réalisées *in vitro*, indiquent que plusieurs protéines Atg peuvent être ciblées par les calpaïnes : Atg3, 4A, 4B, 5, 7, 9, 10, 12 et Beclin-1 (Norman *et al*., 2010). Il a été démontré que le clivage de la protéine Atg5, par les calpaïnes, peut inhiber l'activité autophagique basale. En ce sens, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre la calpaïne 1, stimule l'activité autophagique, en augmentant les taux de LC3-II et de complexe Atg5-Atg12 (Xia *et al*., 2010; Yousefi *et al*., 2006).

4.5. Régulation par les phospholipides

Bien que le processus autophagique soit régi par des évènements se déroulant à l'interface membrane-cytosol, peu de choses sont actuellement connues sur le rôle joué par les lipides, et les enzymes qui les métabolisent. Les travaux sur ce sujet se sont focalisés sur le phénomène de lipidation de la LC3 ainsi que la synthèse de PI3P par le complexe PI3K-III. En plus de ces deux processus, les lipides peuvent réguler des cascades de signalisation qui

convergent vers la kinase mTOR, et inhiber l'autophagie. En réponse à des facteurs de croissance tels que l'insuline, l'activation de la PI3K-I permet d'augmenter les taux de PIP_3 et de stimuler mTOR *via* la voie Akt/TSC1-2/RHEB (Dall'Armi *et al*., 2014). En ce sens, le traitement des cellules avec du PIP_3 exogène ou l'inhibition de PTEN, la phosphatase du PIP_3, s'accompagne également d'une inhibition de l'autophagie (Arico *et al*., 2001).

Il a récemment été démontré que la GTPase ARF6 participe à la formation d'endosomes pré-autophagiques par un mécanisme dépendant de la phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) 5-kinase. *Via* l'activation de cette kinase, la protéine ARF6 peut en effet stimuler la synthèse de PIP_2 à partir de PI4P (Jenkins & Frohman, 2005 ; Moreau *et al*., 2012). Bien que le rôle du PIP_2 dans la formation des endosomes pré-autophagiques ne soit pas encore totalement élucidé, celui-ci semble être nécessaire au recrutement de la protéine adaptatrice AP2, et à la construction du manteau de clathrine (Antonescu *et al.*, 2011).

5. Rôles physiologiques de l'autophagie

5.1 Contrôle de la qualité du cytoplasme

L'induction de l'autophagie suite à une carence en nutriments est l'une des caractéristiques les plus étudiées du processus. Toutefois, dans des conditions riches en nutriments, l'autophagie est toujours active à un niveau basal. Le rôle de cette autophagie constitutive ne serait pas de préserver le statut énergétique de la cellule puisque celui-ci ne semble pas être affecté par une inhibition de l'autophagie tant que des nutriments sont encore disponibles (Kuma *et al.*, 2004). Sa fonction serait plutôt de maintenir l'homéostasie cellulaire pas le biais de la dégradation d'agrégats protéiques ou d'organites non fonctionnels qui sont toxiques pour la cellule. Des modèles murins d'inhibition de l'autophagie basale par délétion des gènes *Atg5* ou *Atg7* ont permis d'en élucider le rôle. Ainsi, il a été démontré que des protéines ubiquitinylées, des corps d'inclusion et des organites atypiques s'accumulent dans les cellules murines ayant subi une délétion des gènes autophagiques (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006, 2005).

Ce contrôle de la qualité du cytoplasme est indispensable au bon fonctionnement des organismes. Une délétion des gènes autophagiques, au niveau du foie, entraîne une hépatomégalie et une insuffisance hépatique, tandis que leur délétion dans les cellules neurales s'accompagne d'une neurodégénérescence et de déficits moteurs. Au niveau des muscles squelettiques, l'inhibition de l'autophagie engendre une atrophie et une faiblesse

musculaire qui récapitulent les caractéristiques morphologiques des myopathies (Masiero *et al.*, 2009). L'extinction de l'autophagie dans les cellules β-pancréatiques conduit à une diminution de leur prolifération ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose. La perte en cellules β-pancréatiques qui en découle se traduit alors par une intolérance au glucose due à une sécrétion insuffisante d'insuline (Jung *et al.*, 2008).

5.2. L'autophagie au cours du développement

Le rôle de l'autophagie au cours du développement embryonnaire n'est pas encore complètement élucidé. Les études menées sur des souris ayant subi une délétion des gènes *Atg5* ou *Atg7* montrent que ces animaux peuvent survivre durant la période fœtale, mais succombent à la première carence nutritionnelle post-natale. En effet, les niveaux d'acides aminés dans le plasma et les tissus sont anormalement faibles chez ces animaux, et l'AMPK est fortement activée au niveau cardiaque, traduisant une insuffisance énergétique. Ces études suggèrent que la production d'acides aminés par le processus autophagique est indispensable au maintien de l'homéostasie et à la survie dans les heures suivant la naissance (Komatsu *et al.*, 2005 ; Kuma *et al.*, 2004).

Ces travaux ne tiennent cependant pas compte de l'importance de l'autophagie au cours des phases très précoces du développement, à savoir la phase préimplantatoire du zygote. Chez les mammifères, la fécondation de l'ovocyte permet la transformation d'une cellule hautement différenciée en une cellule indifférenciée. Cette « reprogrammation » passe par la dégradation massive de protéines et d'ARN messagers maternels, et la synthèse de nouvelles protéines codées par le génome du zygote (Merz *et al.*, 1981 ; Stitzel & Seydoux, 2007). Le laboratoire du Dr Noboru Mizushima a démontré que le processus autophagique pouvait participer à ce phénomène. En effet, l'autophagie est fortement induite suite à la fécondation et serait impliquée dans le recyclage des protéines maternelles. Lorsque le gène codant l'Atg5 est absent de l'ovule et du spermatozoïde, la synthèse de nouvelles protéines est réduite et l'embryon ne dépasse pas le stade huit cellules (Tsukamoto *et al.*, 2008).

Etant donné sa capacité à éliminer de larges portions de cytoplasme devenues obsolètes, il n'est pas étonnant que le l'autophagie soit impliquée dans les processus de différentiation cellulaire, nécessitant un remodelage intense du cytoplasme. C'est par exemple le cas lors de la différenciation érythrocytaire. Au cours de sa maturation, l'érythroblaste perd son noyau et une grande partie de ses organites et protéines pour devenir un réticulocyte, puis un

érythrocyte mature permettant le transport de l'oxygène. Dès les années 60, des premières observations en microscopie électronique révèlent une potentielle implication de l'autophagie dans la dégradation des mitochondries du réticulocyte (Takano-Ohmuro *et al*., 2000 ; Tooze & Davies, 1965). Ce concept a été renforcé par des études plus récentes basées sur la délétion du gène codant la protéine mitophagique BNIP3L. En effet, les érythrocytes matures sont normalement dépourvus de mitochondries et dépendent de la glycolyse pour leurs besoins énergétiques. Les réticulocytes des souris ne pouvant plus exprimer la protéine BNIP3L synthétisent toujours des autophagosomes mais ne peuvent plus éliminer leurs mitochondries. Cette absence de dégradation mitochondriale conduit à une anémie sévère, et une accumulation de précurseurs érythrocytaires (Sandoval *et al.*, 2008 ; Schweers *et al*., 2007). L'implication de l'autophagie dans la maturation des érythrocytes a également été confirmée par le développement de modèles murins invalidés pour certains gènes Atg tels qu'*ULK1* et *Atg7*. Ainsi il a été démontré qu'une délétion du gène codant ULK1 dans les cellules érythroïdes mène à une accumulation du nombre de réticulocytes immatures non fonctionnels dans le sang. Ce phénotype est lié à un défaut de dégradation autophagique des mitochondries ainsi que des ribosomes liés à de l'ARN dans ces cellules (Kundu *et al*., 2008). L'invalidation de l'*Atg7* dans le système hématopoïétique conduit, quant à elle, à l'accumulation de mitochondries altérées et à une mortalité cellulaire prématurée. Ces animaux sont fortement anémiques et meurent 8 à 14 semaines après la naissance (Mortensen *et al*., 2010). Par ailleurs, l'invalidation d'*Atg7* dans le système hématopoïétique altère également la maturation des lymphocytes B et T, mais ne semble pas avoir d'effet sur la lignée myéloïde. En l'absence d'Atg7, les lymphocytes CD4 et CD8 positifs présentent plus de mitochondries, un niveau de superoxydes plus élevé et une plus grande susceptibilité à l'apoptose *in vitro*. Ces cellules sont aussi moins nombreuses dans la circulation (Mortensen *et al*., 2010).

De manière similaire à la lignée hématopoïétique, l'adipogenèse nécessite un fort remodelage cellulaire. Les adipocytes matures proviennent de pré-adipocytes, dérivant eux-mêmes de précurseurs mésenchymateux multipotents. Les adipocytes matures emmagasinent des triglycérides au sein de larges gouttelettes lipidiques. Des études réalisées *in vitro* ont démontré que l'autophagie est fortement induite au cours de cette différenciation. Cependant, lors d'une invalidation des gènes codant l'Atg5 ou l'Atg7, ou suite à l'inhibition de la PI3K-III par le 3-méthyladénine, les cellules expriment moins de marqueurs de différenciation adipocytaire et ne peuvent plus accumuler de triglycérides (Singh *et al*., 2009). Des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires murins peuvent être différenciés en adipocytes en

présence de facteurs adipogéniques, mais ce processus est fortement ralentit lorsque ces cellules proviennent d'animaux *Atg5*$^{-/-}$ (Baerga *et al*., 2009). De plus, il a été démontré que des ARN interférents ciblant LC3 suffisent pour ralentir la formation de gouttelettes lipidiques (Shibata *et al*., 2010).

5.3. Autophagie sélective et modulation du protéome

L'autophagie sélective est un processus qui permet l'adressage au phagophore et la dégradation de substrats spécifiques. Ces substrats peuvent être des organites défectueux, des bactéries ou encore des agrégats protéiques devenus trop larges pour être pris en charge par le protéasome. La sélection de ces cargos se fait grâce à des protéines spécifiques impliquées à la fois dans la reconnaissance du cargo et dans son adressage au phagophore. Ces récepteurs cargo peuvent, en effet, se fixer à la LC3 *via* un motif d'interaction appelé *LC3 interacting region* (LIR ; Fig. 21). A ce jour, plusieurs récepteurs cargo ont été identifiés dans les cellules de mammifères. Parmi ceux-ci, la protéine p62 est l'une des mieux caractérisée. Par sa liaison à l'ubiquitine, p62 permet la dégradation autophagique de cargos ubiquitinylés résultant de stress cellulaires ou d'infections. La liaison entre p62 et l'ubiquitine est de relativement faible affinité, mais elle est compensée par le fait que plusieurs protéines p62 peuvent englober des agrégats polyubiquitinylés en s'homopolymérisant *via* un domaine *Phox and Bem1p* (PB1) situé dans leur région N-terminale (Bjørkøy *et al*., 2005 ; Zaffagnini & Martens, 2016). Le complexe p62-cargo rejoint ensuite le phagophore, grâce à un motif LIR contenu dans la séquence de la protéine p62 (Pankiv *et al*., 2007).

Un deuxième exemple de récepteur cargo est la protéine NBR1. De façon identique à p62, la protéine NBR1 possède un domaine d'association à l'ubiquitine et semble s'accumuler dans les mêmes agrégats protéiques que p62. Néanmoins, la structure de ce domaine diffère de celui de p62, et présente une plus grande affinité pour l'ubiquitine. La protéine NBR1 contient également un motif LIR lui permettant de se lier à la protéine LC3, et donc d'être dirigée vers le phagophore (Kirkin *et al*., 2009).

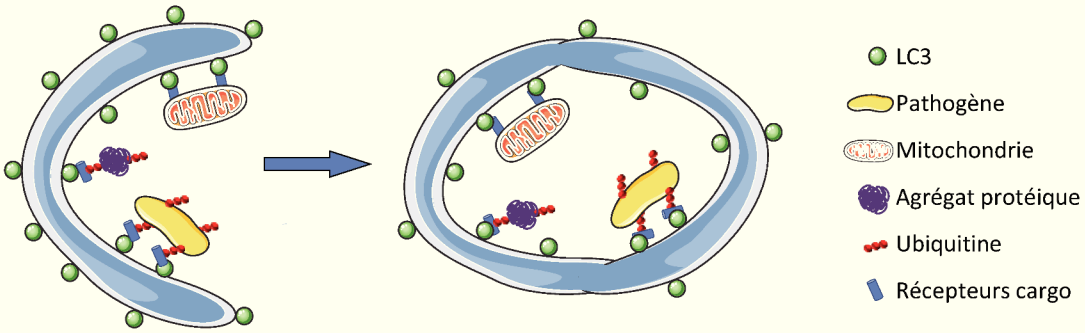


Figure 21 : L'autophagie sélective. Plusieurs substrats autophagiques tels que des agrégats protéiques, des pathogènes et des mitochondries endommagées, sont spécifiquement dirigés vers le phagophore par des récepteurs cargo (p62, NBR1…). Cet adressage dépend d'un domaine LIR présent sur le récepteur et permettant son interaction avec la protéine LC3 qui décore la membrane.

Nous pouvons également citer le complexe AP2, composé des sous unités AP2A1, AP2B1, AP2M1 et AP2S1. L'AP2 forme avec *phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukimia* (PICALM), un complexe adaptateur impliqué dans l'endocytose clathrine-dépendante. Un motif LIR a récemment été identifié sur la sous unité AP2A1, qui est également responsable du recrutement de l'AP2 à la membrane plasmique. Ainsi il a été démontré l'AP2 permet la reconnaissance et la dégradation autophagique du fragment C-terminal du précurseur amyloïde par un processus qui dépend bien de la présence du motif LIR. (Tian *et al*., 2013). Ces travaux suggèrent que l'AP2 serait un récepteur cargo pouvant lier la voie d'endocytose à l'autophagie sélective.

6. Autophagie et cancer

Nombreuses sont les études faisant le lien entre l'autophagie et le cancer mais celui-ci est plus complexe qu'il n'y parait. Etant essentiellement décrit comme un mécanisme de survie, il n'est pas surprenant que l'autophagie puisse faciliter le développement tumorale. Cependant, de façon paradoxale, l'autophagie semble également exercer un rôle oncosuppresseur, suggérant que le rôle de l'autophagie dans le contexte de la tumorigenèse dépend entièrement du contexte.

6.1. Rôle anti-tumoral de l'autophagie

De nombreux travaux ont permis de mettre en lumière un rôle oncosuppresseur de l'autophagie. Les premières observations suspectant un rôle de l'autophagie dans le cancer montrent que les cellules cancéreuses présentent, en général, une capacité autophagique plus réduite que les cellules normales (Schwarze & Seglen, 1985). Cette relation est également

soulignée par les travaux de Huang *et al*. (2010) indiquant que, dans les tumeurs astrocytaires, l'activité autophagique est inversement proportionnelle au grade tumoral. Ces données corrélatives sont renforcées par des travaux menés sur la protéine Beclin-1 (Liang *et al*., 1999). Des délétions mono-alléliques du gène *Beclin-1* sont fréquentes dans différents cancers humains, tels que les cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate (40 à 75 % des cas). Sa surexpression dans des lignées cellulaires humaines de carcinome mammaire restaure leur capacité autophagique et inhibe leur pouvoir tumorigène. Chez la Souris, l'invalidation mono-allélique du gène *Beclin-1* conduit au développement spontané de tumeurs dans de nombreux organes (Liang *et al*., 1999). L'ensemble de ces travaux suggère donc que la *Beclin-1* est un gène oncosuppresseur, agissant par un mécanisme d'haplo-insuffisance. Les travaux de Takamura *et al*. (2011) indiquent que l'invalidation du gène codant l'Atg7 dans le foie de Souris C57 augmente le développement spontané d'adénomes hépatiques. Ces hépatocytes, déficients en autophagie, présentent une accumulation de la protéine p62, de mitochondries altérées, un stress oxydant ainsi que des dommages à l'ADN. Enfin, il est intéressant de noter qu'en accord avec ces résultats, d'autres produits de gènes oncosupresseurs se sont révélés être pro-autophagiques. Parmi eux, nous pouvons citer les protéines de la voie de signalisation PI3K/mTOR, telles que PTEN, TSC1 et TSC2 (Lorin *et al.*, 2008).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle antitumoral de l'autophagie. L'un de ces mécanismes est la prévention des dommages induits à l'ADN. Il a ainsi été démontré que, dans les conditions de stress métabolique, l'inhibition de l'autophagie accroît le niveau d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que les dommages à l'ADN, ce qui se traduit par une accélération de la croissance tumorale (Mathew *et al*., 2007 ; Fig. 22). Dans des cellules possédant un défaut d'apoptose, l'autophagie induite par un stress métabolique peut protéger de la mort nécrotique, et de la réponse inflammatoire qui en résulte. Or, l'inflammation chronique dans les tumeurs est à l'origine d'une libération de cytokines qui favorise la progression tumorale. Ainsi, en empêchant la nécrose, l'autophagie protègerait de l'inflammation et de la progression tumorale (Degenhardt *et al*., 2010). Les travaux récents de Lee *et al*., (2011) suggèrent que l'effet oncosuppresseur de l'autophagie pourrait également être relayé par une régulation de la vascularisation tumorale (Fig. 22). Ainsi, les cellules endothéliales issues de souris invalidées pour l'un des allèles du gène *Beclin-1* (animaux *Beclin-1*$^{+/-}$), présentent des activités de migration, prolifération et tubulogenèse accrues. Ces auteurs observent également une vascularisation plus dense au sein des tumeurs implantées dans des souris *Beclin-1*$^{+/-}$ par rapport à celles implantées dans des souris sauvages. Il apparait

donc qu'une réduction de l'activité autophagique des cellules endothéliales pourrait favoriser la néoangiogenèse et de ce fait, stimuler la croissance tumorale (Fig. 22).

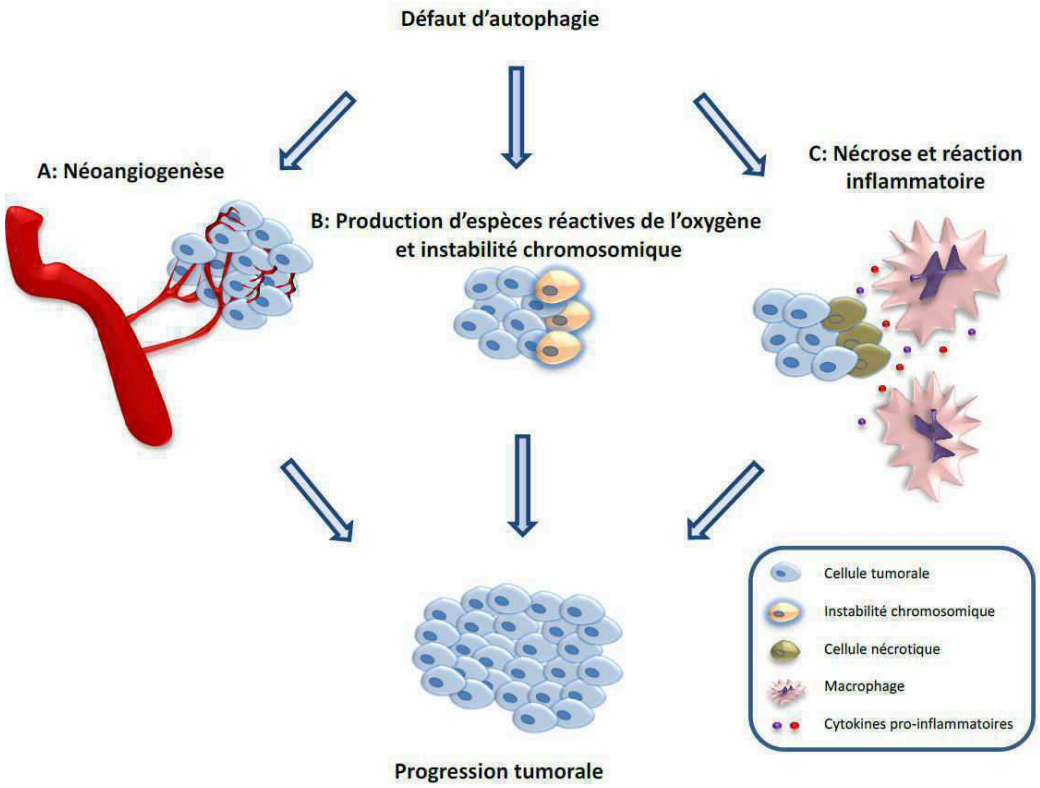


Figure 22 : Rôle anti-tumoral de l'autophagie. Les données de la littérature indiquent qu'une inhibition de l'autophagie pourrait favoriser la croissance tumorale selon trois mécanismes différents. **(A)** La stimulation de la néoangiogenèse tumorale. **(B)** Une augmentation de l'instabilité chromosomique des cellules cancéreuses. Une réduction de l'autophagie et plus particulièrement la mitophagie, conduit à une accumulation de mitochondries défectueuses qui sont une source importante d'espèces réactives de l'oxygène, elles-mêmes responsables d'une instabilité chromosomique par l'induction de dommages à l'ADN. **(C)** Une augmentation de l'inflammation intra-tumorale. Dans des cellules possédant un défaut d'apoptose, l'autophagie induite par un stress métabolique protège de la mort nécrotique. Un défaut d'autophagie dans ces conditions entraîne la nécrose des cellules et donc, le relargage de cytokines pro-inflammatoires.

Les données de la littérature indiquent donc que l'autophagie pourrait inhiber l'initiation tumorale en limitant les processus d'inflammation, d'instabilité génomique et les dommages tissulaires. Il est alors envisageable qu'une stimulation de l'activité autophagique puisse prévenir le cancer dans certains contextes. En accord avec cette notion, il a été proposé que les effets bénéfiques de la restriction calorique et l'activité physique sur la longévité et la prévention du cancer pourraient être attribués à l'autophagie (Blagosklonny, 2010 ; He *et al.*, 2012 ; Masiero *et al.*, 2009). De plus, le traitement des patients à la metformine, un activateur

de la voie de l'AMPK stimulant l'autophagie, est associé à une réduction du risque d'apparition de différents types de cancers (Malek *et al*., 2013).

6.2. Rôle pro-tumoral de l'autophagie

Bien que les nombreuses études résumées dans le paragraphe précédent plaident en faveur d'un rôle oncosuppresseur de l'autophagie, d'autres travaux montrent que l'autophagie pourrait participer à la progression tumorale. C'est notamment le cas des tumeurs solides, au sein desquelles les cellules sont exposées à un stress métabolique, du fait de la faible vascularisation qui limite l'apport en nutriments et en oxygène. Dans ce contexte, les cellules cancéreuses dépendraient alors du processus autophagique afin de faire face à leurs besoins métaboliques et maintenir leur homéostasie énergétique. En accord avec cette hypothèse, l'activité autophagique est accrue dans les régions hypoxiques de certaines tumeurs et l'invalidation de gène codant la Beclin-1 accélère la mort cellulaire dans ces régions (Degenhardt *et al*., 2010 ; Karantza-Wadsworth *et al*., 2007). L'autophagie est également élevée dans des cellules transformées par l'oncogène Ras, et participe à leur survie et leur propriétés pro-tumorales (Lock *et al*., 2011). Ainsi, un défaut d'autophagie dans ces cellules, et l'accumulation de mitochondries endommagées qui en résulte, pourraient limiter la tumorigenèse en détériorant le stock de mitochondries fonctionnelles (Guo *et al*., 2011).

L'ensemble de ces données indique que l'autophagie joue un double rôle au cours de la progression tumorale. De façon simplifiée, il est concevable qu'elle permette de limiter les étapes initiales de la tumorigenèse en limitant la prolifération cellulaire et les dommages à l'ADN. Dans les étapes plus tardives de la progression tumorale, l'autophagie pourrait favoriser la survie des cellules carencées en nutriments et oxygène, situées dans les régions centrales de la tumeur.

6.3. La modulation de l'autophagie pour améliorer les traitements contre le cancer

Ces relations entre la tumorigenèse et l'autophagie sont à prendre en considération dans le contexte des thérapies anticancéreuses. Qu'ils soient déjà utilisés en clinique ou encore au stade expérimental, de nombreux traitements anticancéreux induisent l'autophagie au sein des cellules cancéreuses. C'est par exemple le cas du tamoxifène, de la rapamycine, du témozolomide ou encore des radiations ionisantes (Kondo *et al*., 2005 ; Sui *et al*., 2013).

Cette induction du processus autophagique semble être une forme de cytoprotection mise en place par les cellules tumorales pour résister aux différentes thérapies. Il n'est alors pas surprenant que la combinaison des thérapies actuelles avec une inhibition de l'autophagie soit en train d'émerger en tant que stratégie prometteuse contre les cancers résistants. Plusieurs approches sont alors proposées pour inhiber l'autophagie : *i)* inhiber la dégradation du cargo au niveau du lysosome *ii)* inhiber les composants essentiels de la machinerie autophagique.

L'approche la plus avancée pour inhiber l'autophagie dans le contexte d'une thérapie anticancéreuse repose sur l'utilisation de l'hydroxychloroquine (HCQ), un dérivé moins toxique de la chloroquine. A ce jour, plusieurs essais cliniques de phase I ou II ont été réalisés. Il en ressort qu'à des doses suffisamment basses pour ne pas être toxiques, l'inhibition du flux autophagique chez les patients n'est pas systématique, soulignant la nécessité de développer des analogues plus puissants, mais moins toxiques. Cependant, même à ces faibles doses, la combinaison de l'HCQ à certaines thérapies classiques s'est révélée être étonnamment efficace chez des patients souffrant de mélanome, de carcinome rénal, de cancer du côlon ou de myélome, suggérant que certains sous-types de cancers seraient plus sensibles à ce genre de stratégie (Mahalingam *et al*., 2014 ; Rebecca & Amaravadi, 2016 ; Vogl *et al*., 2014). Afin d'approfondir ce concept, des dérivés plus puissant de l'HCQ, tel que le Lys05, sont actuellement en cours de développement (McAfee *et al*., 2012).

Les approches initiales, visant la machinerie autophagique, ciblent essentiellement les enzymes qui régissent la formation de l'autophagosome. Des inhibiteurs spécifiques de la kinase Vps34, inclue dans le complexe PI3K-III, ont récemment été développés, et sont capables de ralentir la prolifération des cellules tumorales et d'induire leur mort (Pasquier *et al.*, 2015 ; Ronan *et al*., 2014). Les protéines ULK1 et ULK2 sont également des cibles potentielles pour lesquels des inhibiteurs sont actuellement en phase de développement (Egan *et al*., 2015 ; Petherick *et al*., 2015).

7. Autophagie et migration cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, le processus autophagique est capable de réguler un grand nombre de phénomènes physiologiques et physiopathologiques au sein de la cellule. Il existe également un certain nombre d'études faisant le lien entre l'autophagie et la

migration cellulaire. Néanmoins, le lien fonctionnel entre ces deux processus reste encore mal compris, et certaines de ces études semblent contradictoires.

7.1. Effet pro-migratoire de l'autophagie

Certains travaux proposent que l'autophagie puisse faciliter la motilité cellulaire. En effet, une inhibition de l'autophagie par des ARN interférents ciblant l'Atg12, bloque les propriétés invasives de la lignée de cellules de gliomes GL261 (Macintosh *et al*., 2012). De plus, l'inhibition de l'autophagie, par des approches pharmacologiques ou génétiques, bloque également la migration et l'invasion induite par l'activation des récepteurs Toll-like 1 et 2 dans des lignées dérivées de carcinomes pulmonaires (Zhan *et al*., 2014).

D'un point de vu mécanistique, cette caractéristique pro-migratoire de l'autophagie pourrait s'expliquer par sa capacité à réguler le désassemblage des complexes d'adhésion. De récentes études démontrent que l'inhibition de l'autophagie par la déplétion de protéines Atg conduit à une accumulation de complexes d'adhésion anormalement larges, à l'avant de la cellule (Kenific *et al.,* 2016). En effet, au cours de l'avancée de la cellule vers le stimulus chimiotactique, les complexes d'adhésion doivent être désassemblés afin de permettre le détachement cellule/MEC et le recyclage des protéines d'adhésion vers le front de migration. Lorsque l'autophagie est active, une co-localisation des protéines LC3 et NBR1 avec les complexes d'adhésion en cours de désassemblage est observée. Ces structures LC3-positives retrouvées à la membrane pourraient correspondre à des phagophores, ou à des endosomes pré-autophagiques prêts à diriger les protéines d'adhésion vers le phagophore. La présence de la protéine NBR1 au front de migration renforce l'hypothèse selon laquelle l'autophagie sélective participe à la dissociation des complexes d'adhésion. Une interaction de NBR1 avec plusieurs protéines d'adhésion, telles que la vinculine, la zyxine et la paxilline, a été mise en évidence, et une surexpression de NBR1 accélère le désassemblage des complexes d'adhésion. Ces effets dépendent à la fois du motif LIR et du domaine de liaison à l'ubiquitine de NBR1 (Kenific *et al*., 2016). Dans une étude indépendante, Sharifi et collaborateurs ont observé la présence d'un motif LIR dans la région N-terminale de la paxilline, permettant son interaction directe avec la protéine LC3, et sa dégradation par autophagie. L'utilisation d'ARN interférents, dirigés contre la LC3, conduit à une accumulation de la paxilline, ainsi qu'à une réduction de la motilité cellulaire (Sharifi *et al*., 2016). L'ensemble de ces travaux suggère que l'autophagie participe activement à la déstabilisation et au désassemblage des

complexes d'adhésion qui seraient devenus trop larges pour être désassemblés par d'autres mécanismes, tels que ceux impliquant les calpaïnes (Fig. 23).

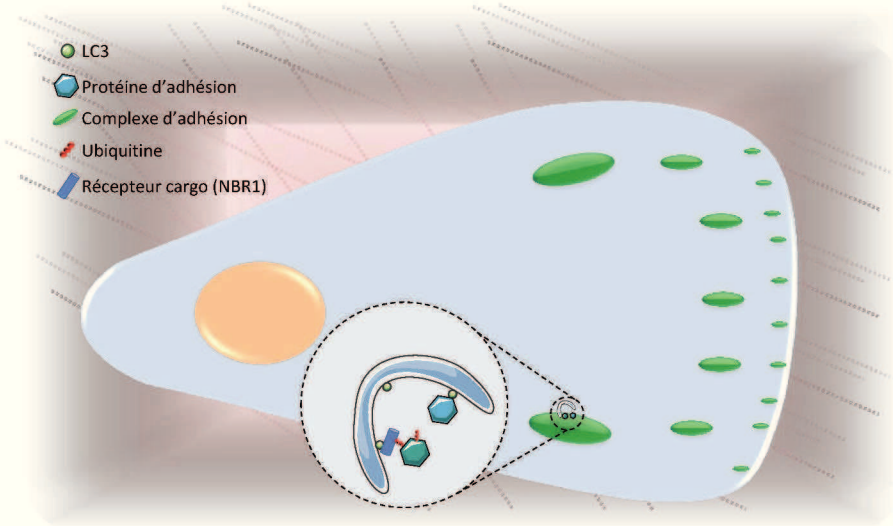


Figure 23 : Désassemblage de larges complexes d'adhésion par autophagie sélective. Des récepteurs cargo tels que NBR1 possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine et à la LC3. Ils peuvent ainsi se fixer aux protéines d'adhésion ubiquitinylées et recruter le phagophore. La paxilline possède également un motif LIR et pourrait donc être capturée par le phagophore sans l'intermédiaire d'un récepteur cargo.

Il est intéressant de noter qu'une analyse protéomique des endosomes pré-autophagiques Atg16L1-postifs a révélé la présence d'un certain nombre de protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et l'expansion du lamellipode, telles la cortactine, la cofiline-1 ou encore la girdine (Morozova *et al.*, 2015). De plus, une interrogation de la base de données iLIR (https://ilir.warwick.ac.uk), répertoriant l'ensemble des protéines contenant un motif LIR potentiel, révèle que l'adhésion cellulaire est le processus biologique dans lequel le plus de protéines ont été retrouvées. Parmi les protéines répertoriées dans cette base de donnée, nous pouvons citer la taline-1 et 2 ou encore l'intégrine β4 (Fig. 24).

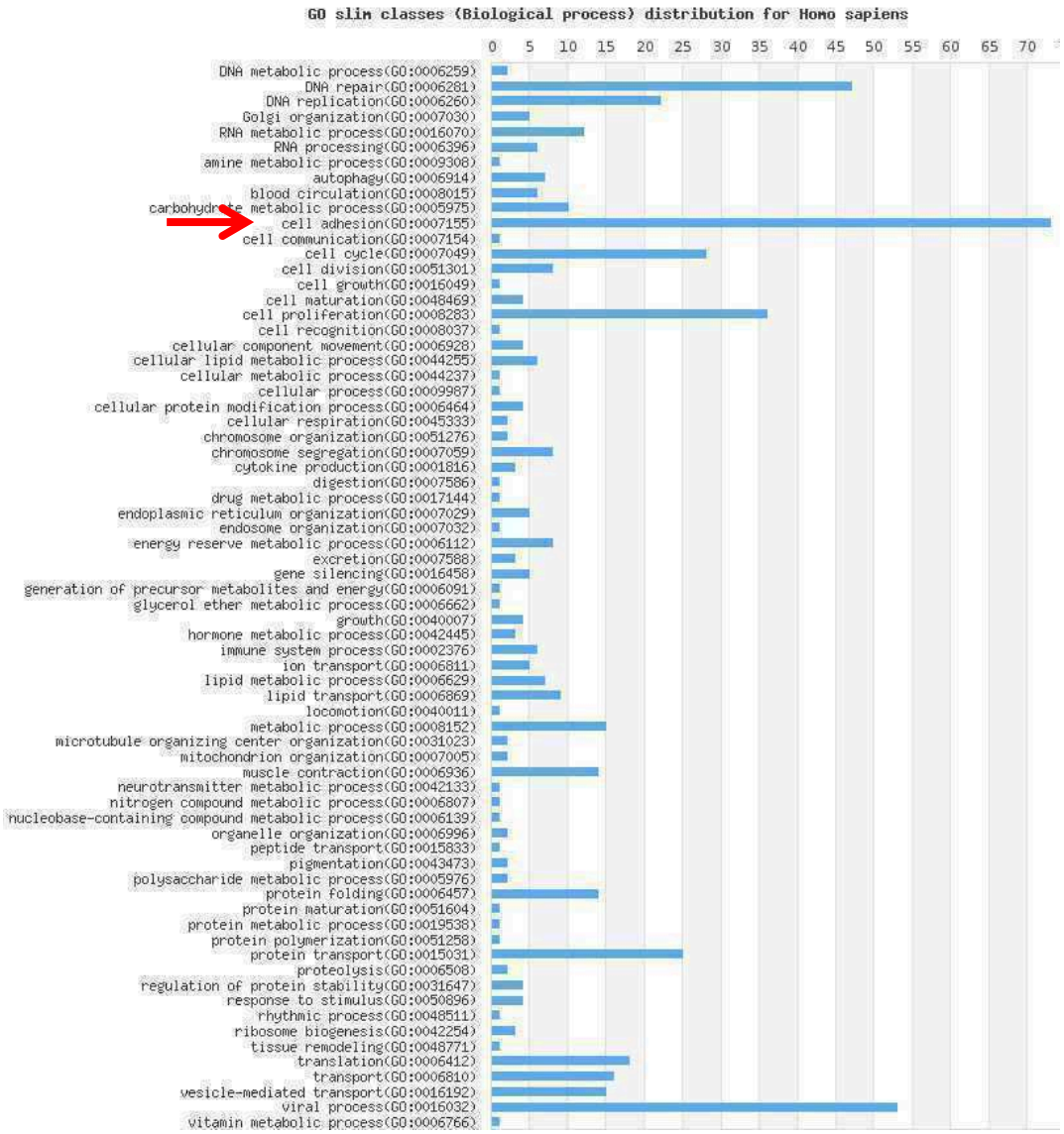


Figure 24 : L'autophagie sélective. Une analyse *in silico* révèle que l'adhésion cellulaire est le processus biologique dans lequel le plus de protéines contenant un motif LIR potentiel sont retrouvées. https://ilir.warwick.ac.uk/statres.php?organism=4&goclass=1

7.2. Effet anti-migratoire de l'autophagie

Un certain nombre d'études proposent que l'autophagie puisse inhiber la motilité cellulaire. Il a été démontré que plusieurs protéines participant à la formation des complexes d'adhésion et à l'expansion du lamellipode, peuvent être dégradées par autophagie. L'équipe du Dr Patrice Codogno a récemment démontré que l'intégrine β1 pouvait être un substrat de l'autophagie. L'invalidation des gènes codant l'Atg7, l'Atg5 ou l'Atg3 dans des cellules *mouse embryonic fibroblast* (MEF) augmente le recyclage de cette intégrine à la membrane plasmique, ainsi que les capacités migratoires des cellules (Tuloup-Minguez *et al.*, 2013). Par ailleurs, de récents travaux se sont intéressés à la GTPase RhoA, impliquée dans le

remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la migration cellulaire. Ils ont démontré que RhoA ainsi que son activateur, l'échangeur GEF-H1, sont des substrats autophagiques, et l'inhibition de l'autophagie engendre alors une accumulation de la forme active de RhoA, au niveau de la membrane plasmique (Belaid *et al*., 2014 ; Yoshida *et al*., 2016). Les travaux de Yoshida *et al*. (2014) indiquent que l'inhibition de l'autophagie augmente également la motilité de cellules MEF.

Nous voyons donc que l'impact d'une modulation de l'activité autophagique sur la migration cellulaire est toujours sujet à controverses. Il est troublant de voir des données de la littérature qui semblent se contredire ainsi, alors que les techniques utilisées pour moduler l'autophagie et évaluer l'activité migratoire sont similaires. Il est cependant envisageable que ces différences soient liées au type cellulaire considéré. Nous pourrions imaginer que dans certains types cellulaires, le désassemblage des complexes d'adhésion se fasse de manière dynamique, essentiellement grâce à des protéases telles que les calpaïnes. Dans ces cellules, le rôle de l'autophagie au cours du désassemblage des adhésions pourrait donc être relativement mineur. Une activité autophagie intense pourrait alors être délétère pour la formation des adhésions puisqu'elle limiterait la disponibilité des protéines nécessaires à la migration, à l'avant de la cellule. A l'inverse, dans un type cellulaire où l'expression des calpaïnes serait plus faible, des complexes d'adhésion larges et obsolètes pourraient s'accumuler plus facilement. La machinerie autophagique serait alors nécessaire à leur désassemblage et exercerait une action pro-migratoire.

7.3. Autophagie et transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un programme développemental hautement conservé au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales, telles que les jonctions cellule-cellule, et acquièrent un phénotype mésenchymateux. Celui-ci inclut des capacités migratoire et invasive accrues, une résistance plus élevée à l'apoptose et une augmentation de la production de composés de la MEC. C'est un processus essentiel au cours du développement embryonnaire. Il intervient lors de la nidation, de la gastrulation, et au moment de la mise en place du mésoderme et du tube neural. La TEM est également impliquée dans la régénérescence des tissus. En plus de ces fonctions physiologiques, il a été démontré que la TEM joue un rôle majeur dans la progression de certaines formes de cancers malins. En effet, sous l'influence de facteurs environnementaux, elle permet aux cellules

tumorales d'acquérir un pouvoir invasif et métastatique, et de se disséminer à travers le parenchyme et vers d'autres organes (Kalluri & Weinberg, 2009).

Des travaux récents suggèrent que l'autophagie pourrait être un régulateur de la TEM, en contrôlant les niveaux des facteurs de transcription régissant ce programme. L'un de ces facteurs, Twist1, est responsable de la perte des adhésions cellule-cellule médiées par l'E-cadherin et facilite donc la TEM (Yang *et al*., 2004). Lors d'un déficit d'autophagie, induit par une délétion de gènes codant l'Atg3, l'Atg5, l'Atg9 ou l'Atg12, l'accumulation de la protéine p62 permet de stabiliser la protéine Twist1 en la protégeant d'une dégradation par le protéome. Cette augmentation des taux de Twist1 induit une TEM et stimule la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases dans un modèle de souris (Qiang *et al*., 2014). A l'instar de Twist1, deux autres régulateurs de la TEM, les facteurs de transcription SNAIL et SLUG, voient également leur niveau augmenter suite à une inhibition de l'autophagie (Catalano *et al*., 2015).

Objectifs de thèse

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'articulent autour du lien entre la machinerie autophagique et la signalisation des RCPG chimiotactiques. Au regard des données présentées dans l'introduction, il apparait évident que l'autophagie soit impliquée dans les phénomènes de migration chimiotactique. Bien que des données récentes aient démontré une dégradation autophagique de protéines intervenant à différentes étapes de la migration cellulaire, l'impact d'une modulation de l'autophagie sur ce processus demeure sujet à controverse. L'autophagie a été décrite comme un processus pro-migratoire et pro-invasif dans certaines études, alors que d'autres travaux indiquent que l'inactivation des protéines pro-autophagiques stimule la migration cellulaire. De manière intéressante, l'effet fonctionnel des RCPG chimiotactiques sur l'activité autophagique reste largement inexploré. Sur la base de ces données, nous avons donc entrepris d'étudier le lien fonctionnel entre les RCPG chimiotactiques et la machinerie autophagique. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules HEK-293 transfectées à l'aide de construits permettant l'expression des RCPG CXCR4 et UT, ainsi que des cellules de glioblastome U87, exprimant ces deux RCPG de manière endogène.

Les objectifs de ce travail de thèse sont donc :

1) de mettre en évidence les effets de l'activation des RCPG chimiotactiques sur l'activité autophagique

2) de rechercher les mécanismes intracellulaires par lesquels le CXCR4 et l'UT pourraient moduler le processus autophagique

3) d'évaluer l'impact d'une modulation de l'autophagie sur la migration chimiotactique.

Une meilleure compréhension du lien entre l'autophagie et le chimiotactisme pourrait permettre de définir des stratégies innovantes dans le traitement des glioblastomes de haut grade, particulièrement invasif.

Matériel et méthodes

1. Pharmacologie

Les traitements pharmacologiques utilisés dans cette étude sont les suivants : 3-methyladenine (3-MA; Sigma-Aldrich, M9281), UII (Polypeptide Laboratories, SC1355), SDF-1 (Bio-Techne, 350-NS-050), N-acetyl-Leu-Leu-Norleu-al (ALLN; Sigma-Aldrich, A6186), chloroquine (CQ ; Sigma-Aldrich, C6628), Dynasore (Dyn ; Sigma-Aldrich, D7693), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA; Sigma-Aldrich, E4378) et PP242 (Sigma-Aldrich, P0037).

2. Constructions plasmidiques et ARN interférents

Les ADN complémentaires (ADNc) codant les récepteurs CXCR4 et UT sont insérés dans le vecteur pCMV-MYC-N (BD-Biosciences, PT3282-5), en phase avec l'épitope MYC. Dans les expériences utilisant la protéine MYC-Atg5, nous nous sommes servis de récepteurs non tagués. Dans ces cas, les ADNc codant CXCR4 et l'UT étaient insérés dans le vecteur pcDNA3.1+ (Invitrogen, V790-20). Les vecteurs d'expression codant les protéines de fusion EGFP-LC3B (24920, déposé par Toren Finkel), Flag-calpaïne 1 et Flag-calpaïne 2 (60941 et 60942, déposés par Yi Zhang) proviennent d'Addgene.

Afin de construire le vecteur d'expression codant la protéine de fusion GFP-WIPI1, la région codante de WIPI1 a été amplifiée par PCR à partir d'une préparation d'ADNc de cellules HEK-293, à l'aide d'une amorce sens présentant en 5' un site de restriction pour l'enzyme XhoI (5'-GATCCTCGAGCGATGGAGGCCGAGGCCGC-3') et d'une amorce antisens présentant en 5' un site de restriction pour l'enzyme EcoRI (5'-GATCGAATTCTCATGACTGCTTCGTTTTGCCC-3'). Le fragment de PCR a été digéré par les enzymes de restriction XhoI (Promega Corporation, R6161) et EcoRI (Promega Corporation, R6011), puis cloné en phase avec le vecteur phr-GFP-N1 (Agilent Technologies, 240145).

Le vecteur d'expression codant la protéine Atg5 a également été obtenu suite à une amplification par PCR d'une préparation d'ADNc de cellules HEK-293, à l'aide d'une amorce sens (5'-GATCGGATCCATGACAGATGACAAAGATGTGCT-3') présentant en 5' un site de restriction pour l'enzyme BamHI (Promega Corporation, R6021) et d'une amorce antisens (5'-GATCCTCGAGTCAATCTGTTGGCTGTGGGATG-3') présentant en 5' un site

de restriction pour l'enzyme XhoI. Après digestion, le fragment a été cloné en phase avec le vecteur pcDNA3.1+. Le vecteur d'expression codant la protéine MYC-Atg5 a été obtenu suite à une amplification par PCR à l'aide d'une amorce sens (5'-GATCGTCGACCATGACAGATGACAAAGATGTGC-3') présentant en 5' un site de restriction pour SalI (Promega Corporation, R6051) et d'une amorce antisens (5'-GATCCTCGAGTCAATCTGTTGGCTGTGGGATG-3') présentant en 5' un site de restriction pour XhoI. Après digestion, le fragment a été cloné en phase avec le vecteur pCMV-MYC-N.

Afin de produire le mutant d'Atg5 ($Atg5^{K130R}$) défaillant pour le processus de conjugaison à l'Atg12, le plasmide codant l'Atg5 a été muté dans le but de remplacer le résidu lysine en position 130 par une arginine. La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du kit QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, 200523) en utilisant les amorces spécifiques 5'-TTTATGTCATGTATGAGAGAAGCTGATGCTTTA-3' et 5'-TAAAGCATCAGCTTCTCTCATACATGACATAAA-3'. Tous les construits ont été vérifiés par séquençage.

Les ARN interférents contrôle (D-001810-03), ciblant l'Atg5 (4 indépendants : J-004374-07, J-004374-08, J-004374-09, J-004374-10), la calpaïne 1 (L-005799) et la calpaïne 2 (L-005804) proviennent de GE Healthcare, Dharmacon.

3. Culture cellulaire et transfections

La lignée cellulaire U87 de glioblastome multiforme U87 (Organisation Mondiale de la Santé grade IV) provient de *l'American Type Culture Collection* (ATCC). La lignée cellulaire HEK-293 (ATCC, CRL1573^{TM}) a généreusement été offerte par les Dr L. Prézeau, C. Barrère et I. Bidaud (IGF, Montpellier, France). Ces cellules ont été maintenues dans un milieu de culture DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium* ; Gibco, 41965-039) complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco, 14025) et 1% d'antibiotiques/antifongiques. Les cellules ont été cultivées en atmosphère humide, à 37°C, 5% CO_2 et les cultures ont été repiquées lorsqu'elles atteignaient 85-95% de confluence. Pour toutes les expériences, les cellules ont été cultivées dans du DMEM avec ou sans SVF, ou dans de l'HBSS (*Hank's balanced salt solution*). Les transfections transitoires ont été réalisées à l'aide du kit *Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V* (Lonza, VCA-1003) ou du kit FuGene HD (Promega Corporation, E2311) en suivant les instructions des fournisseurs. Pour les expériences utilisant

les ARN interférents dirigés contre les calpaïnes 1 et 2, les cellules ont subi deux cycles de transfections, espacés de 72 h, afin de réduire au maximum les niveaux d'expression de ces deux protéines à longue demi-vie (Zhang *et al.*, 1996). Les cellules ont été utilisées dans nos expériences 24 h après la transfection.

4. Immunocytochimie et analyse d'images

Les cellules HEK-293 et U87 ont été ensemencées sur des lamelles de verres pré-coatées à la fibronectine (25 µg/mL, 4°C, toute la nuit ; Sigma-Aldrich, F0895). Après les différents traitements, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (10 min ; 4 % ; Sigma-Aldrich, 252549), perméabilisées avec du Triton X-100 (5 min ; 0,05 % ; Sigma-Aldrich, T9284) dans du PBS puis incubées pendant 1 h dans une solution de blocage contenant 10 % de SVF et 2 % de NDS (*Normal Donkey Serum* ; Sigma-Aldrich, D9663). Les cellules ont ensuite été incubées toute la nuit à 4°C dans une solution de PBS contenant du SVF (1 %), du NDS (0,2 %) ainsi que les anticorps primaires. Les anticorps utilisés au cours de cette étude sont les suivants : anti-SQSTM1/p62 (Abcam AB56416), anti-vinculine (Sigma-Aldrich, V9264), anti-FLAG (Sigma-Aldrich, F1804), anti-MYC (Santa Cruz Biotechnology, sc-40), anti-Atg16L1 (Cell Signaling Technology, 8089), anti-N-cadhérine (R&D Systems, AF6426). Après rinçage, les cellules ont été incubées pendant 2 h dans une solution de PBS contenant du SVF (1 %), du NDS (0,2 %) ainsi que les anticorps secondaires : *Alexa Fluor* 488-c*onjugated donkey anti-rabbit* (Invitrogen, A21206), *Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti mouse* (Invitrogen, A21202), *Alexa Fluor 633-conjugated donkey anti-sheep* (Invitrogen, A21100). Les cellules ont ensuite été rincées au PBS et les noyaux ont été marqués avec du DAPI (Invitrogen, D3571). Les lamelles ont été montées sur des lames de verre avec du Mowiol (Merk Millipore, 475904). Les préparations ont été examinées grâce à un microscope confocal à balayage laser, Leica TCS SP2 ou SP8.

Dans les expériences s'intéressant aux adhésions cellulaires, le nombre de complexes d'adhésion par cellule a été déterminé à l'aide du logiciel ImageJ, en utilisant un *plug-in* d'analyse de particules après plusieurs traitements successifs de l'image, visant à détecter les complexes d'adhésion. Dans les études de localisation des protéines MYC-Atg5 et FLAG-Calpaïne1/2, l'intensité du signal immunoréactif localisé à la membrane plasmique a été mesuré en définissant une région d'intérêt, grâce au logiciel ImageJ, et en le comparant à l'intensité totale de la cellule (Fig. 25). Le nombre de structures positives pour l'Atg16L1 a

été quantifié grâce à l'outil de comptage automatique de points du logiciel Imaris (Bitplane) (Fig. 26).

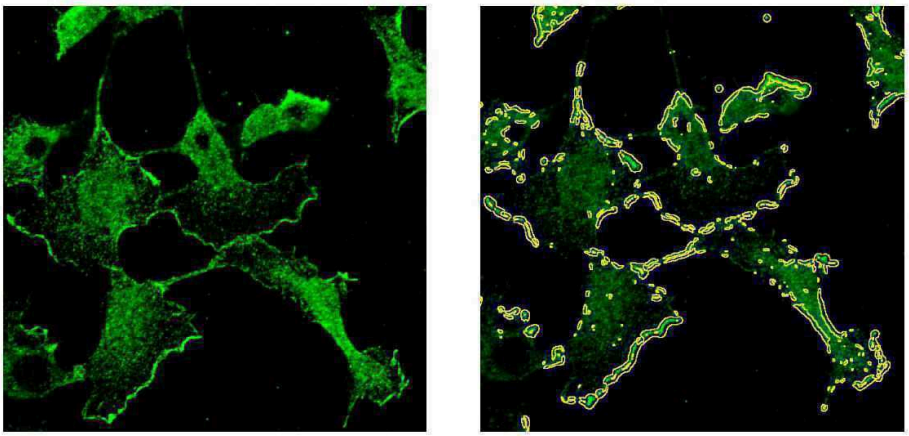


Figure 25 : Quantification du signal immunoréactif MYC-Atg5 membranaire. La proportion de protéine MYC-Atg5 localisée à la membrane plasmique a été évaluée suite à une immunodétection et observation en microscopie confocale. L'image de droite représente la sélection du signal immunoréactif à la membrane plasmique, détecté à l'aide du logiciel imageJ. Le signal membranaire a été quantifié et rapporté au signal total par cellule.

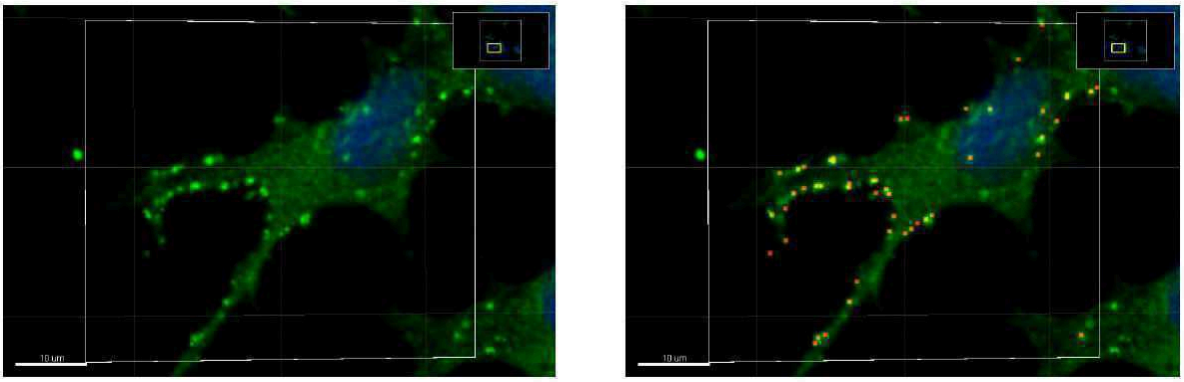


Figure 26 : Quantification des structures Atg16L1-positives. Les structures Atg16L1-positives ont été révélées par immunodétection et observation en microscopie confocale. Le nombre de structures a été évalué grâce aux fonctions de détection automatique (image de droite) et quantification du logiciel Imaris.

5. Evaluation de l'activité autophagique

5.1. Marquage au *Cyto-ID* et cytométrie en flux

Les cellules HEK-293 ont été ensemencées sur des lamelles de verres pré-coatées à la fibronectine. Suite aux différents traitements, les cellules HEK-293 ont été décollées avec une solution d'Accutase (Merk Millipore, SF006), rincées au PBS puis incubées pendant 30 min à

température ambiante dans du DMEM sans rouge de phénol, contenant 5 % de SVF ainsi que la sonde fluorescente *Cyto-ID* (*Cyto-ID Autophagy detection kit ;* Enzo Life Sciences, ENZ-51031K200) diluée à 1/2000. Après rinçage, la suspension cellulaire a été analysée par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Bioscience) dans la longueur d'onde émise (λ=510-530 nm). Les données générées ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel CellQuest Pro.

5.2. Relocalisation des protéines de fusion hrGFP-WIPI1 et EGFP-LC3.

Les cellules HEK-293 et U87 ont été transfectées par le vecteur d'expression pEGFP contenant la région codante de la protéine LC3, ou le vecteur d'expression phrGFP contenant la région codante de la protéine WIPI1. Les cellules ont ensuite été mises en culture sur des lamelles de verre pré-coatées à la fibronectine (25 µg/mL, 4°C, toute la nuit). Suite aux différents traitements, les cultures cellulaires ont été rincées au PBS puis fixées pendant 10 min dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Les lamelles ont été montées sur des lames de microscope avec du Mowiol et les préparations ont été examinées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica TSC SP2. Le nombre de points hrGFP-WIPI1 ou EGFP-LC3 a été évalué grâce à l'outil de comptage automatique de points du logiciel Imaris (Bitplane).

5.3. Accumulation de la protéine p62

Le flux autophagique a été évalué en suivant l'accumulation de la protéine p62 endogène dans les cellules HEK-293 et U87. Suite aux différents traitements, le protocole d'immunocytochimie, décrit précédemment, a été appliqué. Les densités intégrées obtenues à partir d'une vingtaine d'images ont été rapportées au nombre de cellules dans le champ (marquage DAPI), et représentent les niveaux de la protéine p62.

6. Analyse de l'activité calpaïne

L'activité calpaïne dans les cellules HEK-293 a été évaluée à l'aide de la sonde fluorescente t-butoxycarbonyl-Leu-L-Met-chloromethylamino-coumarin (Molecular Probes, A6520). Celle-ci peut être ciblée par les calpaïnes et le produit de clivage émet un signal fluorescent avec une longueur d'onde d'émission maximale localisée à environ 430 nm. Les cellules HEK-293 ont été cultivées sur des lamelles de verre pré-coatées à la fibronectine (25 µg/mL, 4°C, toute la nuit). Elles ont été incubées avec la sonde pendant 20 min à 37°C. Elles ont été rincées, fixées et les lamelles ont été montées sur des lames de microscope afin d'être examinées sur un microscope confocal à balayage laser Leica TSC SP2. Les densités

intégrées obtenues à partir d'une vingtaine d'images ont été rapportées au nombre de cellules dans le champ et sont représentatives de l'activité calpaïne.

7. Test de migration

Les *Transwells* (24 puits; Corning Incorporated, 3422) présentant des membranes poreuses (pores de 8 µm) ont été coatées à la fibronectine (25 µg/mL, 4°C, toute la nuit). Le lendemain, les cellules HEK-293 ou U87 ont été resuspendues dans un milieu sans SVF et ensemencées dans la chambre supérieure des *Transwells* (100000 cellules par *Transwell*). Le gradient est généré par l'ajout de SDF-1 ou d'UII dans la chambre inférieure. Les cellules ont été incubées 24 h à 37°C dans le système. Elles ont été ensuite rincées avec du PBS et les cellules encore présentes dans la chambre supérieure ont été retirées avec un coton-tige. Les cellules ayant migré, situées sur la face inférieure de la membrane, ont été fixées grâce à des bains successifs de méthanol (50, 70, 90 et 100%), marquées avec de l'hématoxiline (Sigma-Aldrich, HHS32) et les membranes ont été montées sur des lames de verre à l'aide de Mowiol. Enfin, elles ont été photographiées avec un microscope Nikon à raison de 10 champs par membrane (Fig. 27). Le nombre de cellules par image a été déterminé à l'aide du *plug-in* « Cell counter » du logiciel ImageJ.

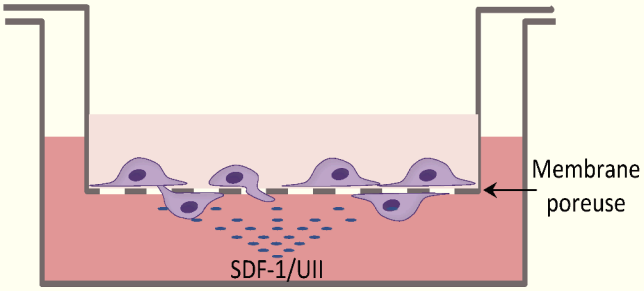


Figure 27 : Test de migration en *transwells*. Les cellules HEK-293 ou U87 sont placées dans la chambre supérieure du *transwell*, sur une membrane pré-coatée à la fibronectine. La chambre inférieure contient les facteurs chimioattractants (SDF-1 ou UII) qui stimulent les cellules à traverser la membrane.

8. Transcription inverse et PCR quantitative (RT-qPCR)

Les ARN totaux ont été extraits avec une solution à base de trizol (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich, T9424) et purifiés sur colonne à l'aide du kit *NucleoSpin® RNA II* (Macherey-Nagel, 740955-250) en suivant les instructions du fournisseur.

Les ARN totaux (1 µg) ont été convertis en ADN complémentaires (ADNc) grâce au kit de transcription inverse, *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, A3800). La réaction de qPCR a été réalisée dans le mélange FAST SYBR Green PCR master

mix (Applied Biosystems, 4472908) auquel ont été ajoutés les ADNc ainsi que les amorces sens et antisens spécifiques des différents gènes d'intérêt (Tab. 1). L'amplification a été réalisée à l'aide du thermocycleur ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), comme suit : 20 s à 95°C, 40 cycles d'amplification (dénaturation : 3 s à 95°C ; hybridation/élongation : 30 s à 60°C). Chaque échantillon a été soumis, en parallèle, à une réaction de qPCR en présence d'amorces spécifiques d'un gène de référence, la protéine YWHAZ. La quantité d'amplicons, pour les gènes d'intérêt, présente dans chaque échantillon a été calculée grâce à la méthode de comparaison des *threshold cycle* (Ct) préconisée par le constructeur, à l'aide de la formule $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, où $\Delta Ct = Ct_{cible} - Ct_{YWHAZ}$, et $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{échantillon} - \Delta Ct_{contrôle}$.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées lors des protocoles de RT-qPCR.

Atg5	Amorce sens	5'-AAAGATGTGCTTCGAGATGTGT-3'
	Amorce anti-sens	5'-CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA-3'
Calpaïne 1	Amorce sens	5'-GAAGCGTCCCACGGAACTG-3'
	Amorce anti-sens	5'-GTGCAGGAGGGTGTCGTTG-3'
Calpaïne 2	Amorce sens	5'-GTTCTGGCAATACGGCGAGT-3'
	Amorce anti-sens	5'-CTTCGGCTGAATGCACAAAGA-3'
YWHAZ	Amorce sens	5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3'
	Amorces anti-sens	5'-CCGCCAGGACAAACCAGAT-3'

9. Western Blot

Suite aux différents traitements, les cellules HEK-293 ont été rincées dans du PBS puis grattées dans du tampon de lyse froid (20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA [Sigma-Aldrich, E5134], cocktail d'inhibiteurs de protéase [Sigma-Aldrich, S8820]) et homogénéisées par des passages dans une aiguille. Les lysats cellulaires ont été supplémentés avec 10% de détergent NP-40 (Sigma-Aldrich, 74385) et incubés (1 h, 4°C) sous rotation. Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées (12000 g, 30 min, 4°C), et la concentration protéique du surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford. Les échantillons protéiques ont été mélangés avec un volume égal de tampon de Laemmli 2x (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 4% SDS, 0,02% bleu de bromophénol, 10% β-mercaptoethanol). Ils ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE 12%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (Merk Millipore, IPVH00010) à l'aide du Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad). Les sites non-spécifiques ont été bloqués avec du lait écrémé 5% dans du TBS (10 mM Tris 0,15 M, pH 8,0) pendant 1 h à

température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires toute la nuit à 4°C sous agitation. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anti-Atg5 (Novus Biologicals, NB-110-53818), anti-calpaïne 1 (Cell Signaling Technology, 2556) et anti-calpaïne 2 (Cell Signaling Technology, 2539). Après plusieurs rinçages, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires *HRP-conjugated* dirigés contre des IgG de lapin (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004) ou de souris (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005). Après plusieurs rinçages, les bandes immunoréactives ont été visualisées à l'aide du kit ECL Western blotting substrate (GE Healthcare, 29018903) et du système d'imagerie ChemiDoc (Biorad). L'anticorps anti-actine β (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) a été utilisé pour les contrôles de dépôts.

Résultats

Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis

Pierre-Michaël Coly, Nicolas Perzo, Vadim Le Joncour, Céline Lecointre, Marie-Thérèse Schouft, Laurence Desrues, Marie-Christine Tonon, Olivier Wurtz, Pierrick Gandolfo, Hélène Castel and Fabrice Morin.

Les résultats présentés dans cet article révèlent un nouveau lien entre la signalisation des RCPG chimiotactiques et la machinerie autophagique. Nous démontrons que l'activation de deux RCPG, le CXCR4 et l'UT, inhibe la biogenèse des autophagosomes, en bloquant la formation d'endosomes pré-autophagiques, à partir de la membrane plasmique. Cette inhibition est relayée par l'activation de calpaïnes, et semble être nécessaire à la formation de complexes d'adhésion, ainsi qu'à la migration directionnelle induite par les RCPG chimiotactiques.

Autophagy (2016), **12**:1–19

AUTOPHAGY
2016, VOL. 12, NO. 12, 1–19
http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1235125

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH PAPER

Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis

Pierre-Michaël Coly[a,b], Nicolas Perzo[a,b], Vadim Le Joncour[a,b], Céline Lecointre[a,b], Marie-Thérèse Schouft[a,b], Laurence Desrues[a,b], Marie-Christine Tonon[a,b], Olivier Wurtz[a,b], Pierrick Gandolfo[a,b], Hélène Castel[a,b], and Fabrice Morin[a,b]

[a]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, Rouen, France; [b]Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France

ABSTRACT
Chemotactic migration is a fundamental behavior of cells and its regulation is particularly relevant in physiological processes such as organogenesis and angiogenesis, as well as in pathological processes such as tumor metastasis. The majority of chemotactic stimuli activate cell surface receptors that belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. Although the autophagy machinery has been shown to play a role in cell migration, its mode of regulation by chemotactic GPCRs remains largely unexplored. We found that ligand-induced activation of 2 chemotactic GPCRs, the chemokine receptor CXCR4 and the urotensin 2 receptor UTS2R, triggers a marked reduction in the biogenesis of autophagosomes, in both HEK-293 and U87 glioblastoma cells. Chemotactic GPCRs exert their anti-autophagic effects through the activation of CAPNs, which prevent the formation of pre-autophagosomal vesicles from the plasma membrane. We further demonstrated that CXCR4- or UTS2R-induced inhibition of autophagy favors the formation of adhesion complexes to the extracellular matrix and is required for chemotactic migration. Altogether, our data reveal a new link between GPCR signaling and the autophagy machinery, and may help to envisage therapeutic strategies in pathological processes such as cancer cell invasion.

ARTICLE HISTORY
Received 8 June 2016
Revised 24 August 2016
Accepted 7 September 2016

KEYWORDS
autophagosome biogenesis; cell adhesion; chemotactic migration; CXCR4; GPCR; urotensin II

Introduction

Cell migration is a key aspect of many physiological processes, including angiogenesis, immune cell trafficking, and organogenesis, as well as pathological processes such as tumor progression and metastasis. In response to chemotactic stimuli, actin polymerization at the front of the cell drives the formation of membrane protrusions, referred to as lamellipodia. Subsequently, lamellipodia are stabilized by attachment to the extracellular matrix through integrin-mediated adhesion complexes. Once coupled to adhesion complexes, the actin cytoskeleton can then generate the forces necessary to translocate the cell body forward.[1]

The majority of chemotactic stimuli, including the chemotactic cytokines (chemokines), bind to cell surface receptors that belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. As a prototypical chemokine receptor, the GPCR named CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4) has received much attention. Activation of CXCR4 by its ligand, CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12), has been shown to play a crucial role in the chemotaxis of many cell types including leucocytes, endothelial cells, neurons[2,3] and a wide range of cancer cells.[4,5] Although not fully elucidated, the signaling mechanisms by which CXCR4 promotes cell migration appear to involve the coordinated activation of the small GTPases RAC and RHOA, which participate in the formation of lamellipodia and contractile actin-myosin filaments.[6] Besides "classical" chemokine receptors, several other GPCRs display chemotactic activity. This includes receptors for bioactive lipids, and for vasoactive peptides such as angiotensin II, EDNs/endothelins and UTS2 (urotensin 2). UTS2 is the most potent vasoactive peptide identified so far, and binding of UTS2 to its cognate GPCR, UTS2R (urotensin 2 receptor), stimulates the migration of glioma cells,[7] fibroblasts,[8] endothelial progenitor cells,[9] monocytes,[10] LNCaP prostatic[11] and colon cancer cells.[12] Importantly, UTS2-induced migration of glioma cells, endothelial progenitors and LNCaP requires the activation of RHOA,[7,9,11] pointing to the idea that CXCR4 and UTS2R engage similar signaling mechanisms during chemotaxis.

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an evolutionarily conserved lysosomal pathway involved in the degradation of long-lived proteins and cytoplasmic organelles. This process, which is essential for normal turnover of cellular compartments, is upregulated in response to nutrient starvation. One of the first events in autophagy is the formation of the phagophore. The edges of these phagophore membranes elongate and thereby engulf portions of cytoplasm. After the scission of the membrane edges, the structure becomes a completed autophagosome, which later

CONTACT Fabrice Morin fabrice.morin@univ-rouen.fr Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, Team Astrocyte and Vascular Niche, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France; Hélène Castel Helene.castel@univ-rouen.fr Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, Team Astrocyte and Vascular Niche, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/kaup.

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2016 Taylor & Francis

fuses with lysosomes, resulting in the degradation of its lumenal content. Several highly conserved autophagy-related (ATG) proteins that function at key steps in the autophagy process have been identified.[13] Initiation of the phagophore requires the BECN1/Beclin 1-containing class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) complex, generation of phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P), and recruitment of the PtdIns3P-binding protein called WIPI1.[14] WIPI1 in turn recruits the ATG12–ATG5-ATG16L1 ternary complex, along with phosphatidylethanolamine-conjugated MAP1LC3B/LC3B (LC3B-II), which are essential for elongation of the phagophore membrane. Whereas the ATG12–ATG5-ATG16L1 complex decorates the phagophore and dissociates after completion of autophagosome formation,[15] part of LC3B-II remains associated with fully formed autophagosomes.[16,17]

Numerous membrane sources are involved in the formation of autophagosomes, including the endoplasmic reticulum,[18,19] mitochondria,[20] and plasma membrane,[21-23] suggesting that autophagy closely intersects with and depends on various membrane trafficking events inside the cell. Regarding the plasma membrane, it has been demonstrated that clathrin-mediated endocytosis induces the formation of ATG5-ATG16L1-positive vesicles, which traffic through recycling endosomes and ultimately fuel the phagophore.[21,22]

Autophagic activity has been shown to play a role in cell migration.[24-26] Nevertheless, the functional connection between these 2 fundamental processes is still elusive, and the impact of chemotactic GPCRs on the autophagy machinery remains largely unexplored. Several lines of data demonstrated the autophagic degradation of key proteins involved in the initiation and maturation of adhesion complexes, such as integrins,[24] RHOA,[27] PXN (paxillin),[28] the SRC kinase,[29,30] VCL (vinculin) and ZYX (zyxin).[31] We found here that ligand-induced activation of 2 chemotactic GPCRs, CXCR4 or UTS2R, triggers a marked reduction in the biogenesis of autophagosomes. Chemotactic GPCRs do not affect the early intracellular events of autophagy, such as class III PtdIns3K activity, but strongly reduce the targeting of ATG16L1 to pre-autophagosomal vesicles forming from the plasma membrane. We further demonstrated that the anti-autophagic activity of CXCR4 and UTS2R depends on the activation of CAPNs/calpains, favors the formation of adhesion complexes at lamellipodia and is required for chemotactic migration. Collectively, our data, obtained with 2 GPCRs and in 2 cell lines (HEK-293 and U87 glioma cells), lead us to propose that inhibition of autophagy represents a hallmark of chemotaxis and constitutes a necessary event for the maintenance of adequate pools of phospholipids and adhesion-complex proteins at the front of migrating cells.

Results

Activation of chemotactic GPCRs inhibits autophagosome biogenesis

We first evaluated autophagic activity by the use of the Cyto-ID autophagy dye, which has been shown to specifically bind to autophagosomal membranes.[32] Cell fluorescence intensity, measured by flow cytometry, therefore correlates with the amount of autophagosomes.[32] HEK-293 cells were transiently transfected with cDNAs encoding human CXCR4 or UTS2R, and treated with CXCL12 or UTS2, respectively. As shown in Figure 1A, activation of chemotactic GPCRs with their respective ligands significantly reduced Cyto-ID labeling, indicating a reduction in the total number of autophagosomes. This effect could be due to either a decrease in the flux of autophagosome biogenesis, or an increase in the turnover of autophagosomes due to activation of the lysosomal pathway. To distinguish between these 2 possibilities, we compared the effects of each ligand alone, or in combination with chloroquine (CQ), a lysosomotropic agent that neutralizes the acidic pH of lysosomes, thereby preventing autophagosome turnover.[17] As expected, CQ treatment, by inducing accumulation of autophagosomes, evoked an increase in Cyto-ID labeling (Fig. 1B). CXCL12 or UTS2 treatment reduced Cyto-ID labeling to a similar extent in the absence or presence of CQ, indicating that the effects of the ligands likely correspond to inhibition of autophagosome biogenesis.

We next assessed autophagic activity by the use of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-LC3B. LC3B protein is a well-established effector of autophagy and a bona fide marker for autophagosomes.[33,34] Punctate EGFP-LC3B staining provides a measure of ongoing autophagy because it marks the successful processing of a cytosolic form, EGFP-LC3B-I, to EGFP-LC3B-II, a phospholipid-conjugated form that is targeted to phagophore membranes. We found that, in control conditions, the low number of EGFP-LC3B dots per cell precluded the accurate determination of UTS2 or CXCL12's inhibitory effects. Nevertheless, prevention of autophagosome degradation by the use of CQ evoked, as expected, a marked increase in the number of EGFP-LC3B puncta (Fig. 1C and 1D). Treatment with CXCL12 (Fig. 1C) or UTS2 (Fig. 1D) partially prevented the accumulation of the EGFP-LC3B-labeled autophagosomes in the presence of CQ, confirming that chemotactic receptors engage an intracellular signaling pathway leading to inhibition of autophagosome biogenesis. We next evaluated autophagosome accumulation in the presence of CQ, at steady state (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] with 10% serum), or upon serum starvation (Hank's balanced salt solution [HBSS] medium), a condition that stimulates autophagic flux. Activation of CXCR4 or UTS2R with their respective ligands markedly reduced the formation of EGFP-LC3B puncta in cells maintained in both complete or starvation medium (Fig. 1E), indicating that chemotactic GPCRs are able to inhibit autophagosome biogenesis under basal or stimulated conditions.

For further proof of CXCL12- and UTS2-evoked inhibition of autophagy, we performed an immunocytochemical analysis of endogenous SQSTM1/p62 levels. SQSTM1 is a ubiquitously expressed protein that can bind to ubiquitinated substrates and to LC3B on phagophores, and is itself degraded by autophagy.[35,36] Therefore, impaired autophagy is accompanied by the accumulation of SQSTM1 in the cytosol, and formation of SQSTM1-ubiquitinated protein aggregates.[37] As expected, a 6-h treatment with CXCL12 (Fig. 1F) or UTS2 (Fig. 1G) evoked a significant increase in SQSTM1 immunolabeling, which displayed a punctate pattern, reminiscent of cytosolic aggregates.

CXCR4- and UTS2R-evoked inhibition of autophagy is not relayed by MTOR kinase and the class III PtdIns3K complex

As a first step to determine the signaling pathway relaying the anti-autophagic effect of CXCR4 and UTS2R, we next

checked whether CXCL12 or UTS2 had an effect on PP242-induced autophagy. PP242 stimulates autophagy through inhibition of MTOR (mechanistic target of rapamycin [serine/threonine kinase]).[38] In line with starvation-related results, EGFP-LC3B dot formation was markedly increased after incubation with PP242 (Fig. 2A and 2B). Activation of CXCR4 (Fig. 2A) or UTS2R (Fig. 2B) strongly reduced the effects of PP242 on EGFP-LC3B staining. These data were confirmed by the use of the Cyto-ID autophagy fluorescent probe. Treatment of cells with PP242 evoked an increase in Cyto-ID labeling, consistent with autophagy induction, and this effect was reversed by cotreatment with CXCL12 or UTS2 (Fig. S1). The fact that chemotactic GPCRs can still exert potent anti-autophagic activity in the presence of MTOR inhibitors suggests that they act downstream of this kinase.

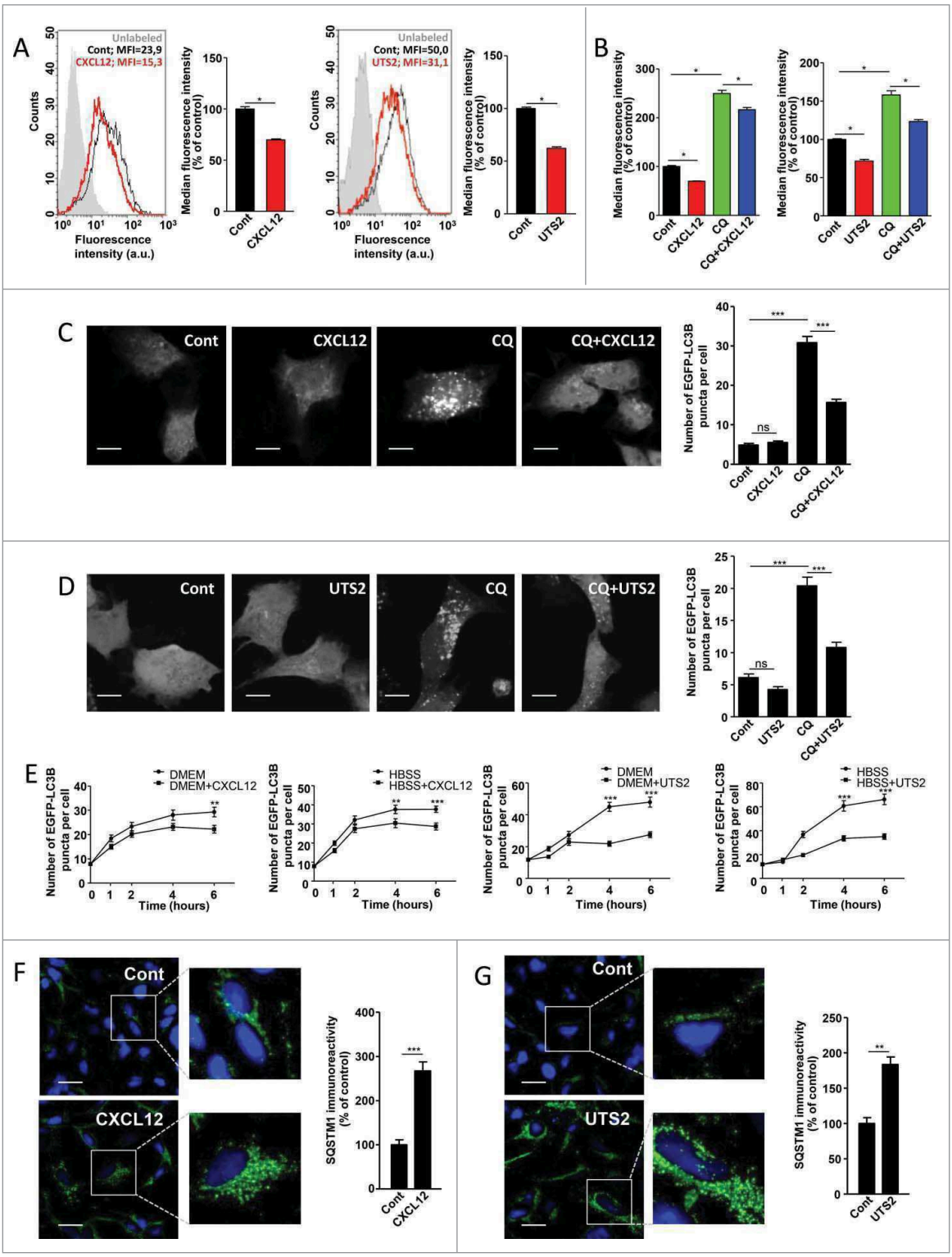


Figure 1. For figure legend, see next page.

Following MTOR inhibition, formation of the phagophore requires the recruitment of the BECN1-containing class III PtdIns3K complex, generation of PtdIns3P and recruitment of the PtdIns3P-binding protein called WIPI1.[14] Quantification of WIPI1 puncta can then be used to monitor autophagy initiation, and constitutes an indicator of class III PtdIns3K activity.[14] As a validation step, we first monitored the number of humanized recombinant (hr)GFP-WIPI1 puncta upon treatment of HEK-293 cells with a class III PtdIns3K inhibitor, 3-methyladenine (3-MA), the autophagy inducer PP242, or a combination of both drugs. As expected, treatment with 3-MA significantly decreased, whereas PP242 significantly increased, the number of hrGFP-WIPI1 puncta (Fig. 2C). Cotreatment of PP242 with 3-MA abolished the effect of PP242 (Fig. 2C), which is in agreement with the sequential involvement of MTOR and the class III PtdIns3K in autophagosome biogenesis. Treatment of HEK-293 cells with CXCL12 or UTS2 had no effect on the number of hrGFP-WIPI1 fluorescent dots, under basal conditions or following autophagy induction by PP242 (Fig. 2D and 2E). These data strongly suggest that chemotactic GPCRs exert their effects independently of the class III PtdIns3K and recruitment of WIPI1 to the phagophore.

Chemotactic GPCRs inhibit the recruitment of ATG16L1 to pre-autophagosomal endocytic vesicles

Recruitment of WIPI1 to the phagophore allows in turn the recruitment of additional proteins of the autophagy machinery, i.e. the ATG12–ATG5-ATG16L1 ternary complex and LC3B. Previous data indicated that endocytic formation of ATG16L1-ATG5-positive vesicles from the plasma membrane plays a key role during autophagy induction, by providing a source of phospholipids to the forming autophagosome membrane.[21-23] We therefore hypothesized that activation of chemotactic GPCRs, at the plasma membrane, may locally affect the formation of these pre-autophagosomal vesicles.

We first tested in our model the importance of endocytosis in the formation of autophagosomes by blocking the scission of endocytic vesicles with Dynasore, an inhibitor of DNM/dynamin.[39] Treatment of HEK-293 cells with Dynasore prevented the CQ-dependent accumulation of EGFP-LC3B puncta (Fig. 3A), indicating that, in agreement with previous reports,[21] endocytic activity was required for the biogenesis of autophagosomes. ATG16L1 has been previously shown to form a complex, via the AP2/adaptin complex, with CLTC (clathrin heavy chain) and to accumulate at the plasma membrane following Dynasore treatment.[21] Accordingly, we observed, in the presence of Dynasore, an increase in the number of ATG16L1-positive structures, located at the plasma membrane (Fig. 3B and 3C; Fig. S2). Activation of CXCR4 or UTS2R with their respective ligands inhibited the Dynasore-induced accumulation of ATG16L1-positive structures (Fig. 3D), suggesting that chemotactic GPCRs exert their anti-autophagic action by reducing the targeting of ATG16L1 to these pre-autophagosomal vesicles.

The anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs depend on ATG5

Previous studies have identified a membrane binding site on ATG5[15] and revealed that recruitment of ATG16L1 to membranes is highly dependent on ATG5.[40] We therefore wondered whether chemotactic GPCR activation could inhibit the recruitment of ATG16L1 to endocytic vesicles by altering the function of ATG5. As a first step, we tested if siRNA knockdown of *ATG5* could mimic the effects of chemotactic GPCR activation. In order to make sure that siRNA effects would not be due to off-target effects, we performed experiments with 4 independent siRNAs interacting with different regions of the *ATG5* transcript. Effectiveness of each siRNA was verified by RT-qPCR (Fig. S3A) and western blot analyses (Fig. S3B). As expected and in agreement with previous reports,[41] the knockdown of *ATG5* reduced the biogenesis of autophagosomes, as evaluated by the accumulation of EGFP-LC3B puncta following CQ treatment (Fig. 4A), and reduced autophagic flux, as evaluated by analysis of SQSTM1 levels (Fig. S3C). We next tested the involvement of ATG5 in ATG16L1-targeting to endocytic vesicles. As was the case for chemotactic GPCR activation, siRNA knockdown of *ATG5*, using any of the individual siRNAs, markedly reduced the Dynasore-induced accumulation of ATG16L1-positive structures at the plasma membrane (Fig. 4B), indicating that ATG5 is required to initiate the formation of pre-autophagosomal vesicles from this compartment.

Figure 1. (See previous page) CXCR4 and UTS2R inhibit autophagosome biogenesis. (A) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panels*) or UTS2R (*right panels*) were treated (24 h) with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M). After treatment, cells were incubated with the Cyto-ID autophagy dye and fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Data shown are cytometric profiles of a representative sample of each experimental group (10,000 cells per sample). a.u., arbitrary units; MFI, median fluorescence intensity; unlabeled, background signal without Cyto-ID incubation. Histograms show the average MFI $\pm$ SEM (n = 4; 10,000 cells per sample). (B) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were treated (24 h) with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M), with or without chloroquine (CQ; 5×10^{-5} M), as indicated. After treatment, cells were incubated with the Cyto-ID autophagy dye and fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Data are expressed as median fluorescence intensity $\pm$ SEM (n = 4; 10,000 cells per sample). (C) HEK-293 cells expressing CXCR4 and the fluorescent protein EGFP-LC3B were treated (6 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M) and chloroquine (5×10^{-5} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified on confocal images. Data represent means $\pm$ SEM, from at least 100 cells per group. Scale bars: 10 μm. (D) HEK-293 cells expressing UTS2R and the fluorescent protein EGFP-LC3B were treated (6 h) with or without UTS2 (10^{-9} M) and chloroquine (5×10^{-5} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (C). Scale bars: 10 μm. (E) *Left 2 panels*: HEK-293 cells expressing CXCR4 and the fluorescent protein EGFP-LC3B were pretreated (1 h) with chloroquine (5×10^{-5} M), then placed in either rich (DMEM, 10% serum) or nutrient-deprived (HBSS) media containing chloroquine, and treated with or without CXCL12 (10^{-8} M) for the indicated times. After incubations, cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (C). *Right 2 panels*: HEK-293 cells expressing UTS2R and the fluorescent protein EGFP-LC3B were pretreated (1 h) with chloroquine (5×10^{-5} M), then placed in either rich (DMEM, 10% serum) or nutrient-deprived (HBSS) media containing chloroquine, and treated with or without UTS2 (10^{-9} M) for the indicated times. After incubations, cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (C). (F) HEK-293 cells expressing CXCR4 were treated (6 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and labeled with an anti-SQSTM1/p62 antibody (green). For each photographic field, SQSTM1 immunoreactivity was quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means $\pm$ SEM from 10 photographic fields per group. Scale bars: 20 μm. (G) HEK-293 cells expressing UTS2R were treated (6 h) with or without UTS2 (10^{-9} M). Cells were fixed and SQSTM1 immunoreactivity was measured as in (F). Scale bars: 20 μm. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test (A, B, F, G) or an unpaired *t* test (C, D, E). $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different.

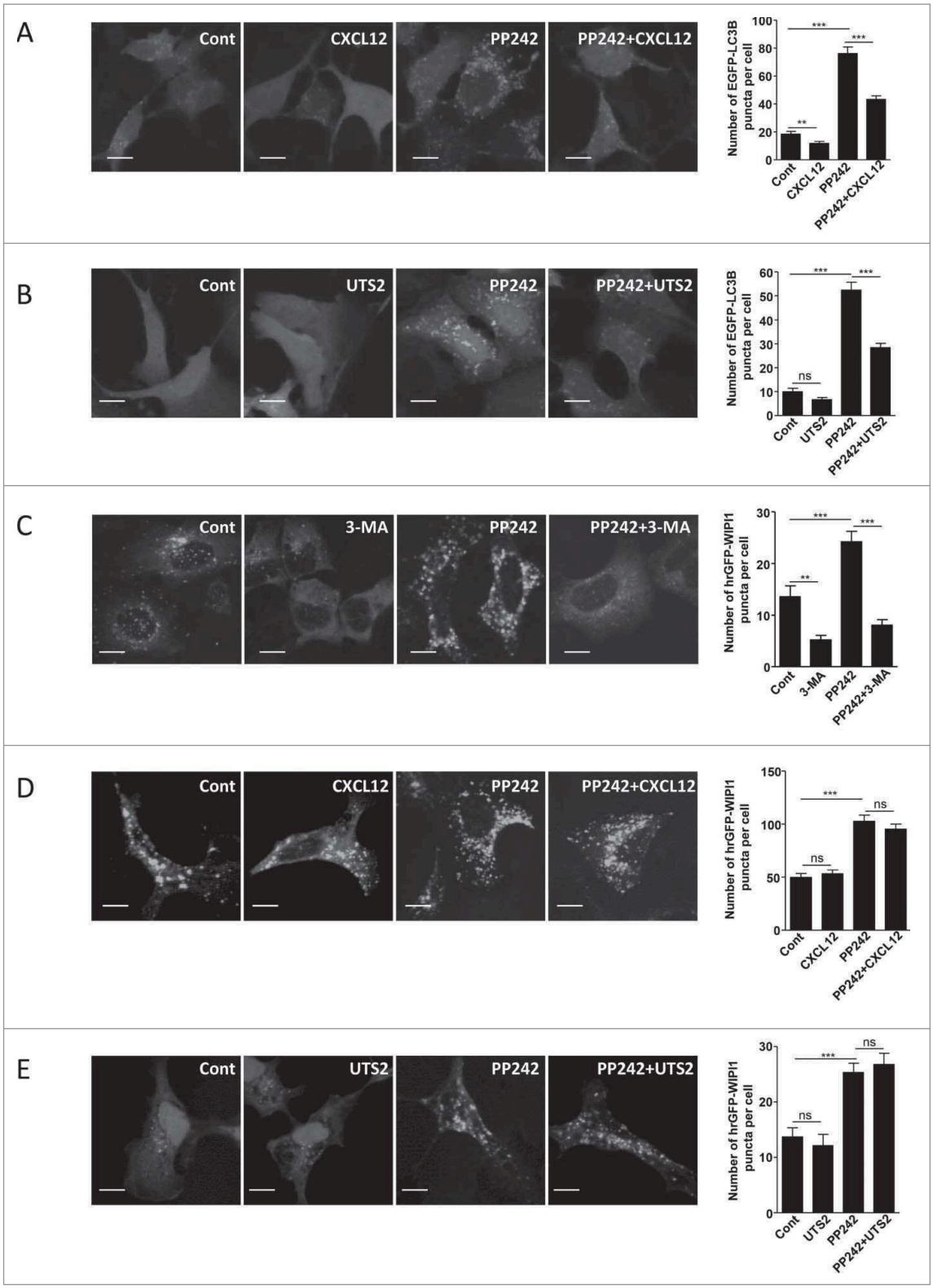


Figure 2. CXCR4- and UTS2R-evoked inhibition of autophagy does not depend on regulation of MTOR kinase or recruitment of WIPI1 to the phagophore. (A) HEK-293 cells expressing CXCR4 and the fluorescent protein EGFP-LC3B were treated (6 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M), and the MTOR inhibitor PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (B) HEK-293 cells expressing UTS2R and the fluorescent protein EGFP-LC3B were treated (6 h) with or without UTS2 (10^{-9} M), and the MTOR inhibitor PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (A). (C) HEK-293 cells expressing the fluorescent protein hrGFP-WIPI1 were treated (4 h) with or without 3-MA (10^{-2} M), a class III PtdIns3K inhibitor, and PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of hrGFP-WIPI1 fluorescent dots per cell was quantified on confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (D) HEK-293 cells expressing CXCR4 and the fluorescent protein hrGFP-WIPI1 were treated (6 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M) and PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of hrGFP-WIPI1 fluorescent dots per cell was quantified as in (C). (E) HEK-293 cells expressing UTS2R and the fluorescent protein hrGFP-WIPI1 were treated (6 h) with or without UTS2 (10^{-9} M) and PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of hrGFP-WIPI1 fluorescent dots per cell was quantified as in (C). Statistical significance was evaluated in all experiments using an unpaired *t* test. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different. Scale bars: 10 μm.

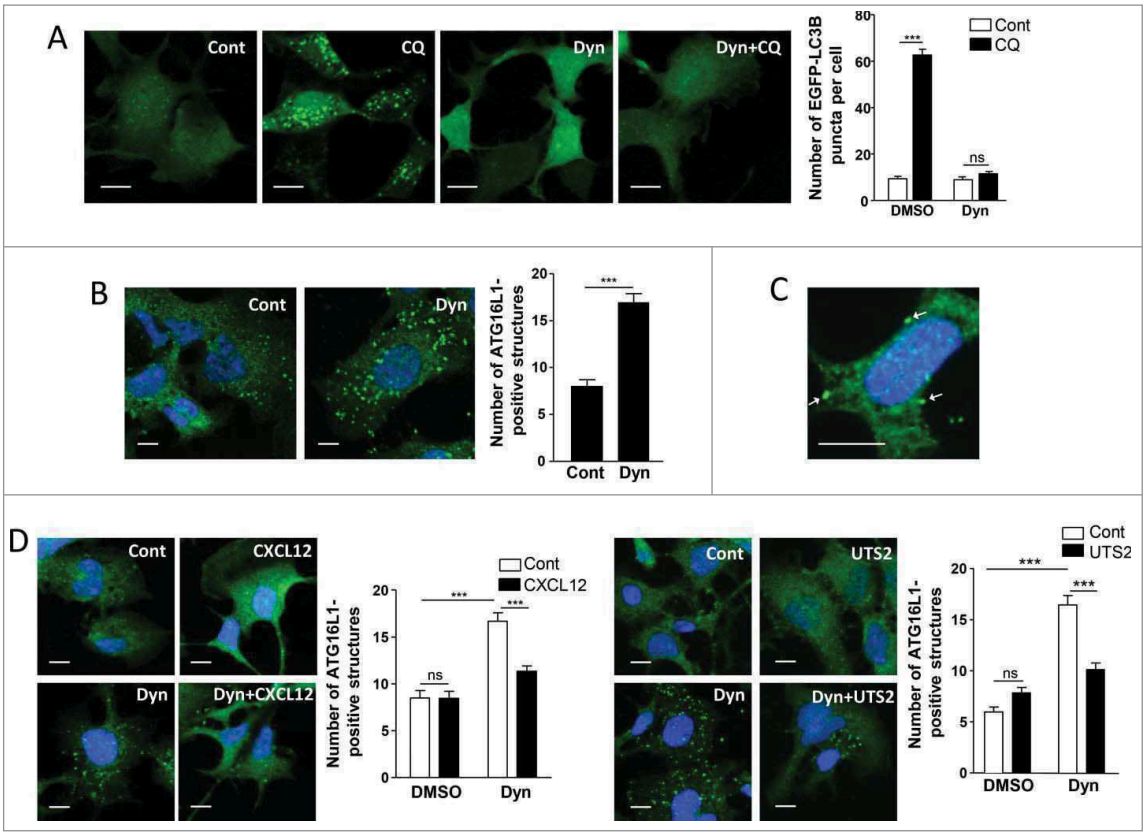


Figure 3. Chemotactic GPCRs inhibit the recruitment of ATG16L1 to pre-autophagosomal endocytic structures. (A) HEK-293 cells expressing the fluorescent protein EGFP-LC3B were treated (6 h) with or without chloroquine (CQ; 5×10^{-5} M) and Dynasore (Dyn; 10^{-4} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (B) HEK-293 cells were starved in HBSS for 1 h with or without Dynasore (10^{-4} M). Cells were fixed and labeled with an anti-ATG16L1 antibody. For each photographic field, the number of ATG16L1-positive structures was quantified and normalized to the number of nuclei. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. (C) Magnified image of ATG16L1-positive structures located at the plasma membrane (arrows) of Dynasore-treated cells. (D) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panels*) or UTS2R (*right panels*) were starved in HBSS for 1 h with the appropriate ligand (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M), in the absence or presence of Dynasore (10^{-4} M), as indicated. Cells were fixed and the number of ATG16L1-positive structures was quantified as in (B). Scale bars: 10 μm. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test (B, D) or an unpaired *t*-test (A). $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different.

We next tested whether CXCL12 or UTS2 treatment could affect the subcellular localization of ATG5. Under control conditions, immunodetection of a MYC-tagged ATG5 showed that a significant fraction of this protein localized at the plasma membrane (Fig. 4C). Quantification of the "plasma membrane/whole cell" immunoreactive signal ratio revealed that CXCR4 and UTS2R activation reduced the pool of ATG5 protein localized at the plasma membrane (Fig. 4C). To rule out potential misinterpretation due to volume variations at the cell periphery, we performed confocal stack acquisitions and z-reconstructions on MYC-ATG5-labeled cells (Fig. S4). We also quantified the amounts of plasma membrane-localized CDH2 (cadherin 2) and found that they were not significantly affected by CXCL12 or UTS2 treatments (Fig. 4D). Together, our data support the view that chemotactic GPCRs inhibit autophagy by hindering the ability of ATG5 to bind the plasma membrane. It should be noted that these effects were not dependent on the energy status of the cells, since they were observed in either DMEM (Fig. 4C), DMEM complemented with 10% serum or starvation (HBSS) medium (Fig. S5A and S5B).

In order to further evaluate this regulatory role of ATG5, we attempted to block the anti-autophagic effects of CXCR4 or UTS2R by overexpressing recombinant ATG5. We first evaluated the impact of ATG5 overexpression on autophagic flux, estimated by the quantification of SQSTM1 immunoreactivity. Interestingly, in the absence of chemotactic factors, SQSTM1 immunoreactivity was not modified by the overexpression of ATG5 (Fig. S6A), suggesting that ATG5 does not constitute a limiting factor under these conditions. However, CXCR4- or UTS2R-induced inhibition of autophagic flux, revealed by a marked increase in SQSTM1 immunoreactivity, was efficiently blocked by overexpression of ATG5. These data, obtained in either DMEM (Fig. S6A), DMEM complemented with 10% serum, or starvation (HBSS) medium (Fig. S6B and S6C), suggest that activation of chemotactic GPCRs hinders ATG5 function which then becomes limiting for autophagic activity.

We next investigated the effect of ATG5 overexpression on the biogenesis of autophagosomes, estimated by the accumulation of EGFP-LC3B puncta in the presence of CQ. Overexpression of ATG5 abolished the inhibitory effects of chemotactic GPCRs on the biogenesis of mature autophagosomes and, once again, these effects were observed in either DMEM (Fig. 4E), DMEM complemented with 10% serum or starvation (HBSS) medium (Fig. S7A and S7B). As a negative control, we performed experiments with a lysine

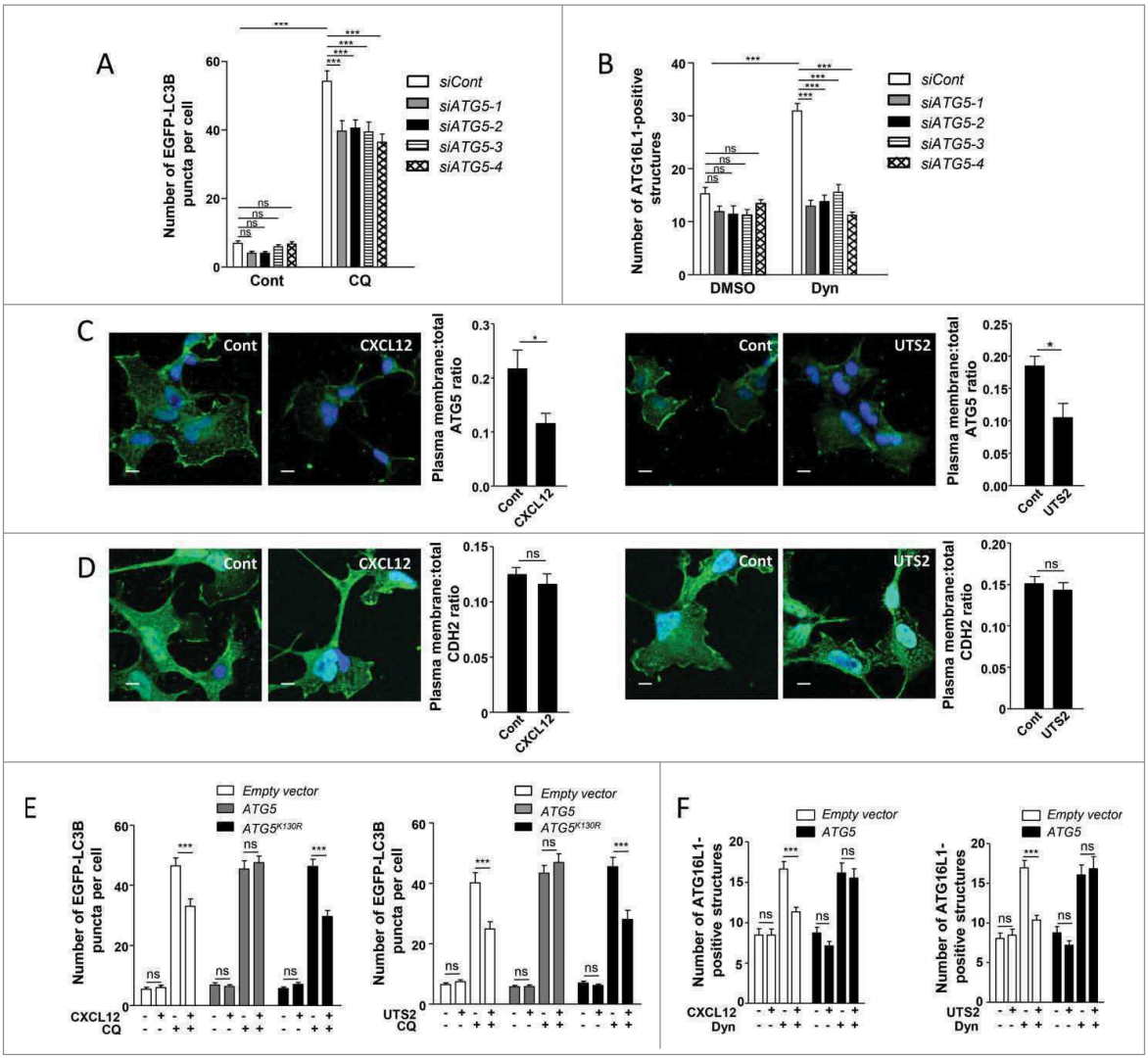


Figure 4. The anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs depend on ATG5. (A) HEK-293 cells were transfected with a vector encoding EGFP-LC3B, together with one of the 4 siRNAs directed against *ATG5* (*siATG5-1, siATG5-2, siATG5-3 and siATG5-4*) or with nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were placed in DMEM without serum for 6 h with or without chloroquine (CQ; 5×10^{-5} M), fixed, and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (B) HEK-293 cells transfected with one of the 4 siRNAs directed against *ATG5* (*siATG5-1, siATG5-2, siATG5-3, siATG5-4*) or with nontargeting siRNA (*siCont*) were starved in HBSS for 1 h with or without Dynasore (*Dyn*; 10^{-4} M), fixed and labeled with an anti-ATG16L1 antibody. For each photographic field, the number of ATG16L1-positive structures was quantified and normalized to the number of nuclei. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. (C) HEK-293 cells expressing MYC-ATG5 together with CXCR4 (*left panels*) or UTS2R (*right panels*) were placed in DMEM without serum for 1 h with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M). Cells were fixed and labeled with an anti-MYC antibody. For each photographic field, the fraction of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Scale bars: 10 μm. (D) HEK-293 cells expressing MYC-ATG5 together with CXCR4 (*left panels*) or UTS2R (*right panels*) were placed in DMEM without serum for 1 h with the appropriate ligand (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M). Cells were fixed and labeled with an anti-CDH2 antibody. For each photographic field, the fraction of CDH2 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Scale bars: 10 μm. (E) HEK-293 cells were transfected with *EGFP-LC3B*, together with either *ATG5*, the *ATG5^{K130R}* mutant or an *empty vector*, and either *CXCR4* (*left panel*) or *UTS2R* (*right panel*). Cells were placed in DMEM without serum for 6 h with or without chloroquine (5×10^{-5} M) and CXCL12 (10^{-8} M, *left panel*) or UTS2 (10^{-9} M, *right panel*). Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (A). (F) HEK-293 cells were transfected with *ATG5* or an *empty vector* together with *CXCR4* (*left panel*) or *UTS2R* (*right panel*). Cells were starved in HBSS for 1 h with or without Dynasore (10^{-4} M) and CXCL12 (10^{-8} M, *left panel*) or UTS2 (10^{-9} M, *right panel*). Cells were fixed and the number of ATG16L1-positive structures was quantified as in (B). Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test (B, C, D, F) or an unpaired *t* test (A, E). $^{*}P < 0.05$; $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different.

mutant of ATG5 (ATG5^{K130R}), which cannot be conjugated with ATG12, hence making it autophagy-incompetent. As expected, overexpression of the ATG5^{K130R} mutant did not interfere with the inhibitory effects of chemotactic GPCRs on autophagosome biogenesis (Fig. 4E, S7A and S7B).

We next evaluated the effects of ATG5 overexpression on the formation of pre-autophagosomal vesicles from the plasma membrane and we found that the inhibitory effects of CXCL12 or UTS2 on the accumulation of ATG16L1-positive structures were completely abolished in cells overexpressing ATG5 (Fig. 4F).

Activation of CAPNs/calpains is a critical relay in the anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs

Several CAPN substrates, such as the clathrin adaptors PICALM and the AP2 complex, participate in the formation of pre-autophagosomal vesicles from the plasma membrane.[21,42]

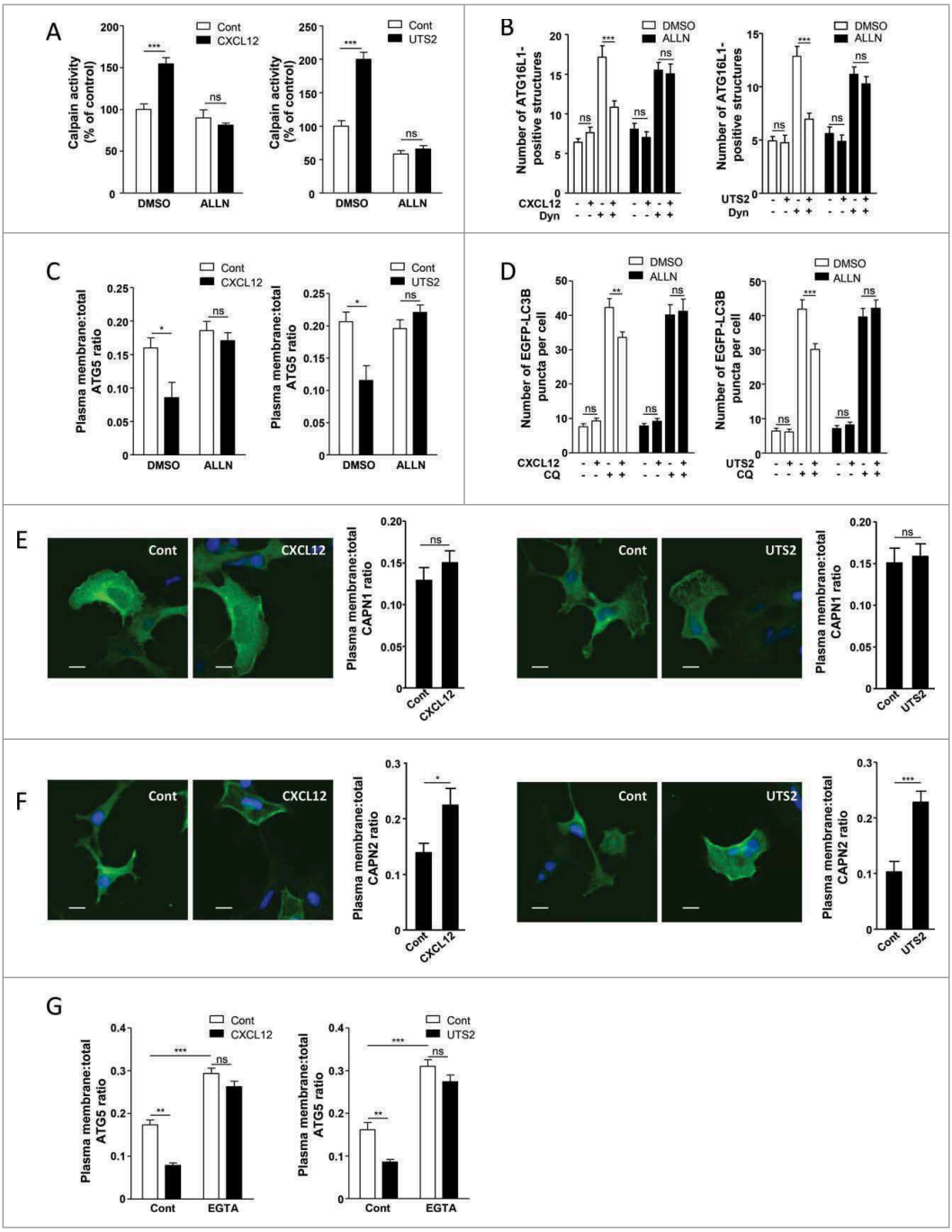


Figure 5. The anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs depend on CAPN activation. (A) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were treated (1 h) with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M), with or without ALLN (10^{-6} M), as indicated. For each group, CAPN activity was measured using the BOC-LM-CMAC fluorescence assay. Data represent means ± SEM from 20 photographic fields per group. (B) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were starved in HBSS for 1 h in the absence or presence of Dynasore (*Dyn*; 10^{-4} M), ALLN (10^{-6} M) and CXCL12 (10^{-8} M, *left panel*) or UTS2 (10^{-9} M, *right panel*) as indicated. Cells were fixed and labeled with an anti-ATG16L1 antibody. For each photographic field, the number of ATG16L1-positive structures was quantified and normalized to the number of nuclei. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. (C) HEK-293 cells expressing MYC-ATG5 together with CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were placed in DMEM without serum for 1 h with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M), with or without ALLN (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and labeled with an anti-MYC antibody. For each photographic field, the fraction of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. (D) HEK-293 cells expressing EGFP-LC3B together with CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were placed in DMEM without serum for 6 h, with or without chloroquine (CQ, 5×10^{-5} M), ALLN (10^{-6} M) and CXCL12 (10^{-8} M, *left panel*) or UTS2 (10^{-9} M, *right panel*) as indicated. Cells were then fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (E) HEK-293 cells expressing Flag-CAPN1 together with CXCR4 (*left panels*) or UTS2R (*right panels*) were placed in DMEM without serum for 1 h with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M). Cells were fixed and labeled with an anti-Flag antibody. For each photographic field, the fraction of Flag-CAPN1 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Scale bars: 10 μm. (F) HEK-293 cells expressing Flag-CAPN2 together with CXCR4 (*left panels*) or UTS2R (*right panels*) were placed in DMEM without serum for 1 h with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M). Cells were fixed and labeled with an anti-Flag antibody. For each photographic field, the fraction of Flag-CAPN2 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Scale bars: 10 μm. (G) HEK-293 cells expressing MYC-ATG5 together with CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were placed in DMEM without serum for 1 h with the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M), with or without EGTA (5×10^{-3} M), as indicated. Cells were fixed and the fraction of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane was evaluated as in (C). Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test (A, B, C, E, F, G) or an unpaired *t* test (D). $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different.

In vivo and in vitro experiments also identified ATG5,[43,44] as well as ATG3, ATG4, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12 and BECN1 as direct CAPN substrates.[45,46] Moreover, CAPNs participate in many aspects of chemotactic migration, including cell spreading and formation of adhesion complexes,[47] and CXCR4 has already been shown to activate CAPNs in neurons.[48] This prompted us to evaluate whether the anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs could be relayed by the activation of CAPNs. We first evaluated CAPN activity in HEK-293 cells using the BOC-LM-CMAC fluorescence assay. By using this approach, we detected an increase in CAPN activity after exposure of cells to either CXCL12 or UTS2 (Fig. 5A). This effect was blocked by co-incubation with the CAPN inhibitor ALLN, thus validating the specificity of the assay (Fig. 5A). We next examined the consequence of CAPN inhibition on the GPCR anti-autophagic effects described so far. The inhibitory effects of CXCL12 or UTS2 on the accumulation of ATG16L1-positive structures, or on MYC-ATG5 localization at the plasma membrane, were completely abolished by co-incubation with the CAPN inhibitor ALLN (Fig. 5B and 5C). We next investigated the involvement of CAPNs on the formation of mature autophagosomes by the use of the EGFP-LC3B marker. CXCL12 or UTS2 treatment significantly reduced the number of EGFP-LC3B puncta upon autophagy induction, and co-incubation with the CAPN inhibitor ALLN totally reversed these effects (Fig. 5D). Consistent with these results, siRNAs directed against either *CAPN1* (calpain 1) or *CAPN2* (calpain 2) also blocked the anti-autophagic actions of CXCL12 or UTS2 (Fig. S8, S9 and S10). Selective knockdown of the appropriate CAPN isoform with each siRNA was successfully confirmed by RT-qPCR and western blot analyses (Fig. S11).

Since GPCR-induced activation of CAPNs reduces the pool of plasma membrane-localized ATG5, recruitment of CAPNs at plasma membrane subdomains may be critical in suppressing the formation of pre-autophagosomal vesicles. We therefore monitored the impact of CXCR4 or UTS2R activation on the subcellular localization of CAPN1 and CAPN2. In the absence of chemotactic factors, significant amounts of Flag-tagged CAPN1 and Flag-tagged CAPN2 were observed at the cell periphery (Fig. 5E and 5F). Although activation of CXCR4 or UTS2R did not seem to affect the subcellular distribution of Flag-CAPN1 (Fig. 5E), activation of either one of the receptors markedly increased the amounts of Flag-CAPN2 localized at the plasma membrane (Fig. 5F). Recruitment of CAPN2 at the plasma membrane through its PtdIns(4,5)P_2 binding domain facilitates its access to specific substrates[49-51] and allows its activation by local increases in calcium concentration resulting from calcium influxes.[52] We therefore tested the effects of extracellular calcium chelation by bathing cells in 5 mM EGTA. In the absence of chemotactic factors, incubation of cells with EGTA significantly increased the amounts of plasma membrane-localized MYC-ATG5 (Fig. 5G). Moreover, EGTA treatment blocked the inhibitory effects of CXCL12 or UTS2 on the localization of MYC-ATG5 at the plasma

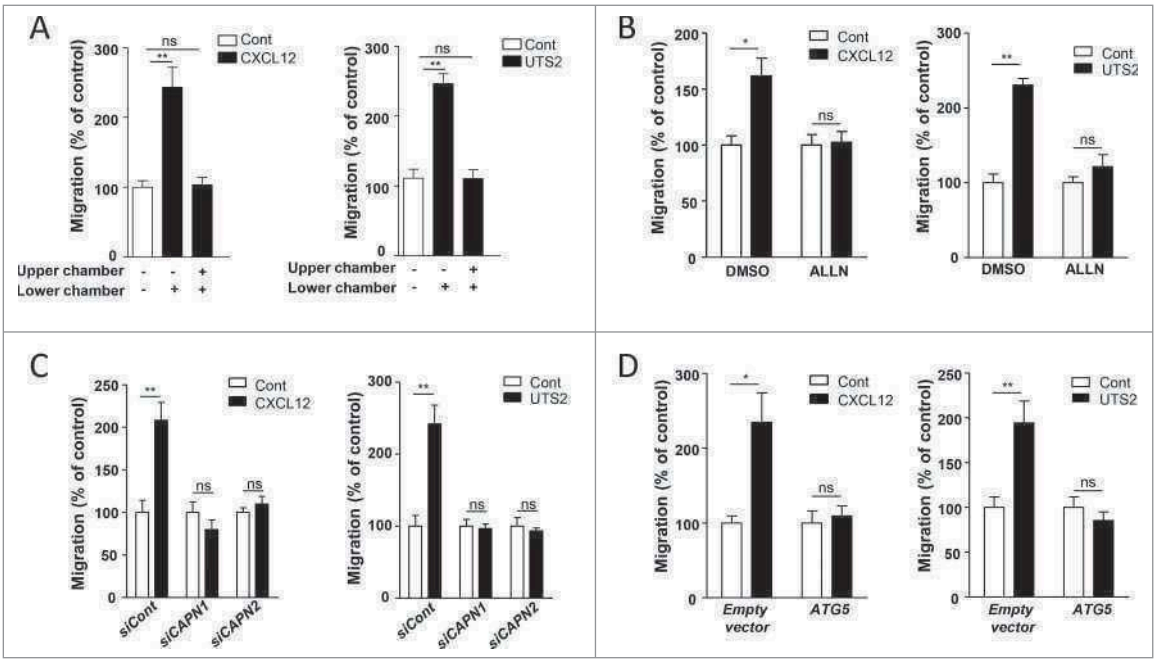


Figure 6. Inhibition of autophagy is required for CXCR4- or UTS2R-induced chemotaxis. (A) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were loaded in the upper chamber of transwells in DMEM without serum, containing or not the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M) in the upper or lower chamber, as indicated. After 24 h, cells that migrated onto the lower surface of the membrane were fixed, stained and counted. Data represent means ± SEM (n = 6). (B) HEK-293 cells expressing CXCR4 (*left panel*) or UTS2R (*right panel*) were pre-incubated (1 h) with ALLN (10^{-6} M), then loaded in the upper chamber of transwells, in DMEM without serum containing ALLN (10^{-6} M) in the upper and bottom chambers, and the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M) in the lower chamber. After 24 h, cell migration was quantified as in (A). (C) HEK-293 cells were transfected with *CXCR4* (*left panel*) or *UTS2R* (*right panel*), together with either siRNA targeting *CAPN1* (*siCAPN1*), *CAPN2* (*siCAPN2*) or with nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were then loaded in the upper chamber of transwells in DMEM without serum, containing or not the respective ligands (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M) in the lower chamber. After 24 h, cell migration was quantified as in (A). (D) HEK-293 cells were transfected with *CXCR4* (*left panel*) or *UTS2R* (*right panel*), together with *ATG5* or an empty vector. Cells were loaded in the upper chamber of transwells in DMEM without serum, containing or not the appropriate ligand (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M) in the lower chamber. After 24 h, cell migration was quantified as in (A). Statistical significance was evaluated in all experiments using a Mann and Whitney test. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; ns, not statistically different.

membrane (Fig. 5G), reinforcing the hypothesis that local activation of CAPNs at the plasma membrane relays the anti-autophagic effects of the receptors.

We finally examined whether activation of CXCR4 or UTS2R could directly induce the CAPN-dependent cleavage of ATG5 in HEK-293 cells. By western blot analyses, we were not able to detect any ATG5 truncation product following activation of the receptors (data not shown), suggesting that CAPNs may reduce the pool of plasma membrane-localized ATG5 in an indirect manner, through the cleavage of yet unidentified proteins facilitating ATG5 anchoring.

The anti-autophagic properties of CXCR4 and UTS2R are required for chemotaxis and formation of adhesion complexes

We next evaluated the directional migration of HEK-293 cells using a transwell chemotaxis assay, in which cells loaded in the upper chamber of the transwell migrate toward the bottom chamber containing the chemoattractant. A gradient of CXCL12 or UTS2 significantly stimulated the migration of HEK-293 cells expressing CXCR4 or UTS2R, respectively (Fig. 6A; Fig. S12). We verified that these effects correspond to chemotaxis rather than stimulation of chemokinesis (random motility) by disrupting the gradients of ligands. Addition of equal concentrations of CXCL12 or UTS2 in the upper and lower chambers of the transwells abolished the stimulatory effects of the ligands (Fig. 6A).

We next tested the effect of the CAPN inhibitor ALLN on cell migration. Treatment of cells with ALLN totally suppressed chemotaxis induced by CXCL12 or UTS2 (Fig. 6B). To confirm these results, we used siRNAs against *CAPN1* or *CAPN2* and we found that, similar to autophagy experiments, the knockdown of either one of these isoforms suppressed the pro-migratory properties of CXCL12 or UTS2 (Fig. 6C). Since CAPNs are well-known regulators of chemotactic migration[47] and may exert their effects independently of autophagy modulation, we next wanted to selectively interfere with the anti-autophagic properties of CXCR4 or UTS2R by overexpressing ATG5. HEK-293 cells overexpressing recombinant ATG5 did not display any chemotactic behavior toward CXCL12 or UTS2 (Fig. 6D), suggesting that inactivation of ATG5 is required for GPCR-induced chemotaxis.

Chemokines are thought to regulate cell migration by coordinating the formation of adhesion complexes at the cell front. We therefore tested the effect of chemotactic GPCRs on the number of adhesion complexes, monitored by the immunodetection of the focal adhesion protein VCL. In control conditions, CXCL12 or UTS2 treatments induced the accumulation of VCL-positive adhesion complexes, mainly found at the periphery of cell protrusions (Fig. 7A and 7B). Similar to chemotactic experiments, overexpression of ATG5 (Fig. 7A and 7B), or CAPN inhibition using ALLN (Fig. 7C and 7D) totally abolished the formation of adhesion complexes induced by CXCL12 or UTS2. We also found that knockdown of *ATG5* induced a significant increase in the number of VCL-positive adhesion complexes, therefore mimicking the effect of CXCL12 and UTS2 treatments (Fig. 7E). It should be noticed that adhesion experiments were performed in either DMEM (Fig. 7), DMEM with serum (Fig. S13) or starvation (HBSS) medium (Fig. S14), and showed almost identical results in these 3 conditions, indicating that these effects did not depend on the cells' energy status.

Collectively, these data suggest that inhibition of autophagy by CXCR4 or UTS2R favors the formation of adhesion complexes and efficient attachment of protrusions to the substratum, a necessary event for forward translocation of the cell body.

Inhibition of autophagy is required for chemotactic migration of glioma cells

Chemotactic migration is a key aspect of many physiological and pathological processes, including cancer progression. Among chemotactic GPCRs, CXCR4 is the most recognized in this process, and is involved in the growth, invasion and metastasis of a wide range of malignant tumors, including gliomas.[4,5] Furthermore, it has recently been demonstrated that UTS2R and UTS2 are highly expressed in fresh glioblastoma explants as well as in glioma cell lines, and mediate chemotactic migration of these tumor cells.[7] We therefore examined whether autophagy inhibition was, as in HEK-293 cells, a crucial step for GPCR-induced chemotaxis of glioma cells.

Using the U87 human glioblastoma cell line, we first tested the effects of CXCL12 or UTS2 on endogenous SQSTM1 expression levels. Similar to HEK-293 cells, treatment of U87 cells with CXCL12 or UTS2 significantly increased SQSTM1 immunolabeling, indicative of autophagic flux inhibition (Fig. 8A and 8B). We next tested the effects of CXCL12 or UTS2 on the number of autophagosomes in control conditions and under CQ, using the EGFP-LC3B puncta method. Once again, the low number of EGFP-LC3B-labeled autophagosomes in control conditions hindered accurate assessment of the effects of CXCL12 (Fig. 8C). However, we observed significant reduction in the number of EGFP-LC3B dots after a 6-h treatment with UTS2 (Fig. 8C). As expected, prevention of autophagosome degradation with CQ markedly increased the number of EGFP-LC3B dots per cell. In these conditions, treatment of cells with CXCL12 and UTS2 partially prevented autophagosome accumulation (Fig. 8C), indicating that activation of these chemotactic GPCRs also led to impaired autophagosome biogenesis in U87 cells.

We next tested whether overexpressing the ATG5 protein could impede CXCR4- and UTS2R-induced chemotactic migration of U87 cells. Using a transwell chemotaxis assay, we first demonstrated that CXCL12 and UTS2 significantly stimulated the migration of U87 cells (Fig. 8D), as previously described.[7,53] We verified that these effects corresponded to chemotactic migration rather than chemokinesis, since addition of equal concentrations of CXCL12 and UTS2 in both chambers of the transwell abolished the stimulatory effects of the ligands (Fig. 8D). As was the case in HEK-293 cells, overexpression of recombinant ATG5 in U87 cells annulled their chemotactic behavior toward CXCL12 or UTS2 (Fig. 8E). We then tested the effects of ATG5 overexpression on the number of focal adhesion complexes in U87 cells. As expected, CXCL12 and UTS2 treatment induced the accumulation of VCL-labeled adhesion complexes at the cell periphery, and overexpression of ATG5 reversed these effects (Fig. 8F).

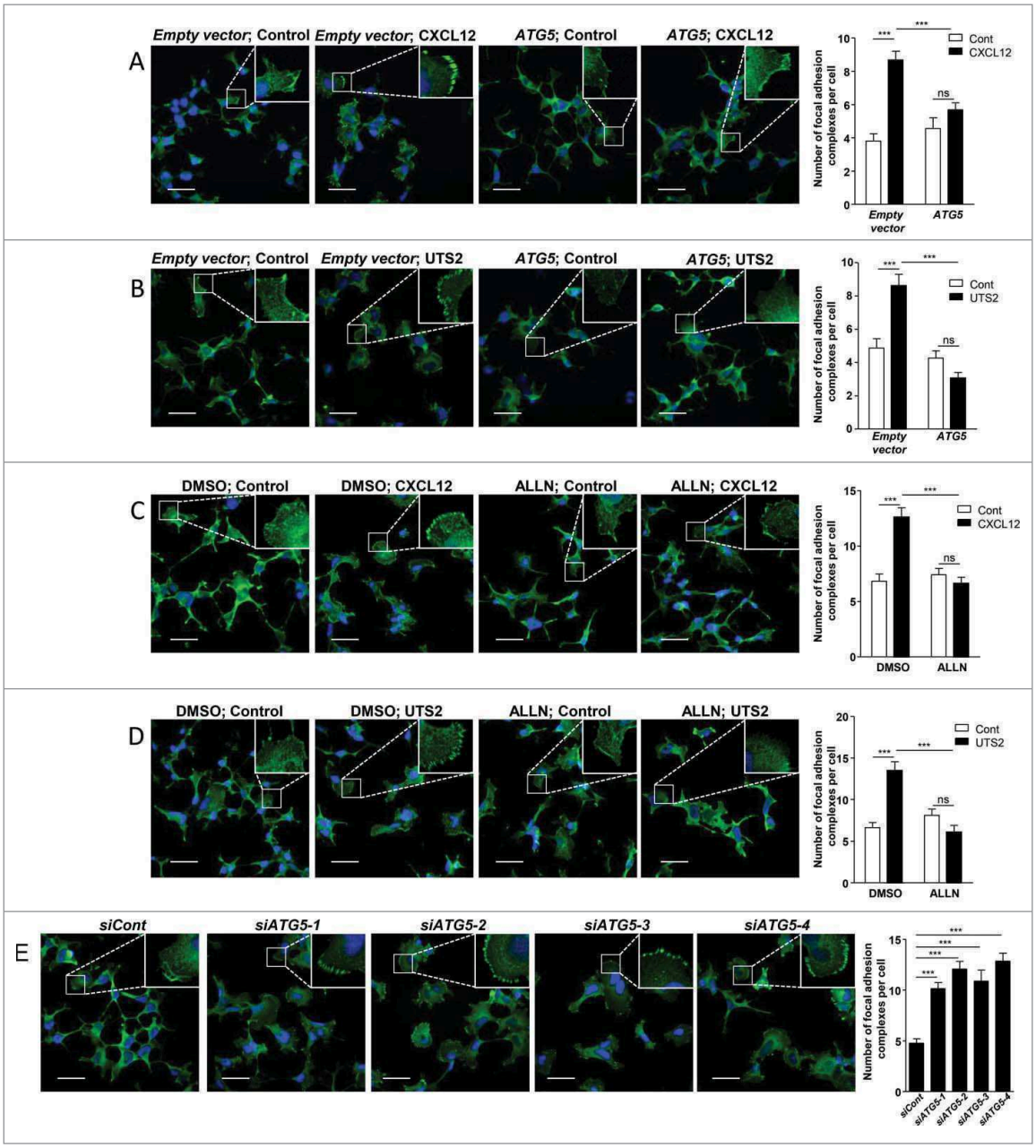


Figure 7. Inhibition of autophagy is required for CXCR4- or UTS2R-induced formation of adhesion complexes. (A) HEK-293 cells were transfected with *CXCR4*, together with *ATG5* or an empty vector. Cells were then placed in DMEM without serum for 1 h in the absence (*Control*) or presence of CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and adhesion complexes were labeled with an anti-VCL antibody (green). For each photographic field, adhesion complexes were quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means ± SEM from 15 fields per group. (B) HEK-293 cells were transfected with *UTS2R* together with *ATG5* or an empty vector. Cells were then placed in DMEM without serum for 1 h in the absence (Control) or presence of UTS2 (10^{-9} M). Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (A). (C) HEK-293 cells expressing CXCR4 were placed in DMEM without serum for 1 h, in the absence (Control) or presence of CXCL12 (10^{-8} M) and ALLN (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (A). (D) HEK-293 cells expressing UTS2R were placed in DMEM without serum for 1 h, in the absence (Control) or presence of UTS2 (10^{-9} M) and ALLN (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (A). (E) HEK-293 cells were transfected with one of the 4 siRNAs targeting *ATG5* (*siATG5-1, siATG5-2, siATG5-3, siATG5-4*) or a nontargeting siRNA (*siCont*). After being placed in DMEM without serum for 1 h, cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (A). Statistical significance was evaluated in all experiments using a Mann and Whitney test. $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different. Scale bars: 50 μm.

Discussion

Data presented in this study provide a new link between GPCR signaling and the autophagy machinery. We found that activation of 2 chemotactic GPCRs, CXCR4 or UTS2R, inhibits a very early phase of autophagosome biogenesis, i.e., the recruitment of ATG16L1 protein to endocytic vesicles. We demonstrated that this anti-autophagic role of CXCR4 and UTS2R represents a key step in the formation of adhesion complexes and efficient cell migration toward chemotactic stimuli. Moreover, experiments done in U87 glioma cells, endogenously expressing both CXCR4 and UTS2R, suggest that GPCR modulation of autophagy may have a profound impact on the invasive properties of cancer cells.

Few GPCRs have been shown to directly regulate autophagic activity.[54] This includes the amino-acid responsive TAS1R1-

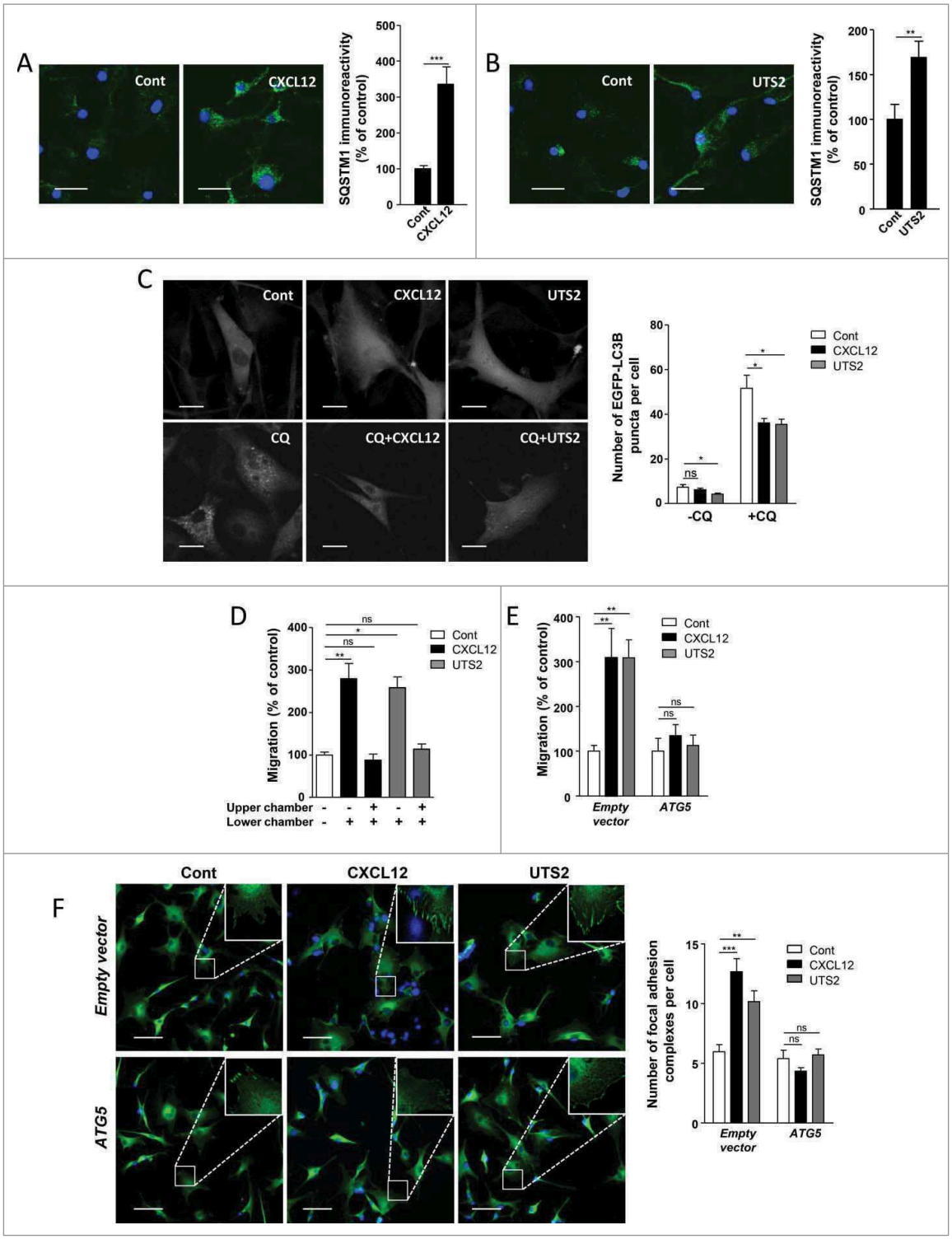


Figure 8. Inhibition of autophagy is required for chemotactic migration of U87 glioma cells. (A) U87 cells were treated (24 h) without (*Cont*) or with CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and labeled with an anti-SQSTM1/p62 antibody (green). For each photographic field, SQSTM1 immunoreactivity was quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means ± SEM from 20 photographic fields per group. Scale bars: 50 μm. (B) U87 cells were treated (24 h) without (*Cont*) or with UTS2 (10^{-8} M). Cells were fixed and SQSTM1 immunoreactivity was quantified as in (A). Scale bars: 50 μm. (C) U87 cells expressing the fluorescent protein EGFP-LC3B were treated (6 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M), UTS2 (10^{-8} M) and chloroquine (CQ; 5×10^{-5} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. Scale bars: 20 μm. (D) U87 cells were loaded in the upper chamber of transwells containing DMEM without serum, with or without CXCL12 (10^{-8} M) or UTS2 (10^{-8} M) in the lower or upper chamber, as indicated. After 24 h, cells that migrated onto the lower surface of the membrane were fixed, stained and counted. Data represent means ± SEM (n = 6). (E) U87 cells were transfected with an *ATG5* expression vector or an empty vector. Cells were loaded in the upper chamber of transwells containing DMEM without serum, with or without CXCL12 (10^{-8} M) or UTS2 (10^{-8} M) in the lower chamber. After 24 h, cell migration was quantified as in (A). Data represent means ± SEM (n = 6). (F) U87 cells were transfected with *ATG5* or an *empty vector*. Cells were then placed in DMEM without serum for 1 h in the absence (Control) or presence of CXCL12 (10^{-8} M) or UTS2 (10^{-8} M). Cells were fixed and adhesion complexes were labeled with an anti-VCL antibody (green). For each photographic field, adhesion complexes were quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means ± SEM from 15 fields per group. Scale bars: 50 μm. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test (A, B, D, E, F) or an unpaired *t* test (C). $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; ns, not statistically different.

TAS1R3 heterodimer, expressed in most tissues.[55] Amino acid signaling through TAS1R1-TAS1R3 activates MTOR kinase, leading to inhibition of class III PtdIns3K activity and reduction of autophagosome biogenesis.[56] AGTRs/angiotensin receptors were also found to inhibit autophagic activity in cardiomyocytes,[57] podocytes[58] and vascular smooth muscle cells,[59] through activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species. Here, we found that CXCR4- and UTS2R-evoked inhibition of autophagy was not relayed by the modulation of MTOR kinase or class III PtdIns3K, but relied on impaired recruitment of ATG16L1 to endocytic vesicles. Accumulation of ATG16L1 at clathrin-coated endocytic structures and vesiculation of ATG16L1-positive precursors from the plasma membrane largely contribute to autophagosome biogenesis.[21-23] Indeed, these ATG16L1-positive vesicles have been shown to undergo SNARE-mediated homotypic fusion or heterotypic fusion with ATG9-positive vesicles, to ultimately deliver an adequate source of phospholipids for the expansion of the phagophore.[22,23,60] The importance of this phenomenon is underlined by our experiments with Dynasore showing that, in agreement with previous studies,[21] endocytic activity was required for the efficient formation of autophagosomes. The exact nature and mode of formation of these precursor vesicles is not fully elucidated. Data from Ravikumar *et al.*[21] demonstrated that CLTC was able to interact, via the AP2 complex, with the amino terminus of ATG16L1. Data obtained here indicate that ATG5 also participates in the recruitment of ATG16L1 to endocytic vesicles. We can speculate that the membrane binding activity of ATG5[40] might allow the initial docking of an ATG5-ATG16L1 complex to the plasma membrane, in order to maximize the probability of interaction between ATG16L1 and AP2-CLTC. We demonstrated that activation of CXCR4 or UTS2R markedly reduced the pool of ATG5 proteins localized at the plasma membrane. Therefore, it can be envisaged that chemotactic GPCRs mainly act by precluding membrane docking of the ATG5-ATG16L1 complex. Alternatively, since ATG5 has been shown to co-immunoprecipitate from cell lysates with ATG16L1 and CLTC,[21] and the N terminus of ATG16L1 allows both AP2-CLTC co-immunoprecipitation[21] and direct ATG5 binding,[15,61,62] it is conceivable that ATG5 may actually act as a "bridge" protein that connects ATG16L1 to the AP2-CLTC complex. Additional work is clearly needed to decipher the exact role of ATG5 in recruitment of ATG16L1 to endocytic vesicles.

CAPNs/calpains are well-characterized modulators of autophagy[43,44,63] and CXCR4 has already been shown to activate CAPNs in neurons.[48] We therefore investigated the involvement of these proteases in the anti-autophagic effects of chemotactic GPCRs. We observed that CAPN inhibition abrogated the autophagy-related effects of CXCR4 and UTS2R, i.e. their abilities to inhibit *i)* association of ATG5 with the plasma membrane, *ii)* recruitment of ATG16L1 to endocytic vesicles, and *iii)* formation of mature LC3B-positive autophagosomes. A previous report has shown that the CAPN-dependent cleavage of ATG5 could tightly control basal autophagy.[44] Our attempts to demonstrate a direct cleavage of ATG5 in our model, following CXCR4 or UTS2R activation, were unsuccessful. This may be due to the fact that only a minor, plasma membrane-associated, fraction of ATG5 undergoes cleavage, or to the potential instability of the cleaved products. Alternatively, the anti-autophagic action of CAPN could depend on the cleavage of other proteins such as PICALM and/or the AP2 complex, since both proteins are critical for the formation of pre-autophagosomal vesicles from the plasma membrane[21,42] and have already been described as CAPN substrates.[64-66] The ATG7 protein, which is also cleaved by CAPNs[67] and is essential for conjugation of ATG5 to ATG12, represents another candidate. Regardless of the CAPN substrate involved, data presented here constitute, to our knowledge, the first demonstration of GPCR-induced modulation of autophagy through the activation of these proteases. We can speculate from the literature that this anti-autophagic pathway, shared by UTS2R and CXCR4, may be relevant in chemotaxis induced by other GPCRs, as well as non-GPCR membrane receptors. Indeed, the spatial regulation of CAPN proteases is involved in many aspects of chemotactic migration, including cell spreading, formation of membrane protrusions, and adhesion complex formation and turnover.[47] Moreover, cell migration triggered by several chemotactic receptors, including the GPCR for N-formylmethionine-leucyL-phenylalanine[51] and the EGF- and VEGF-tyrosine kinase receptors,[68-71] depends on CAPN activation. It will be informative to extend our study to a large panel of chemotactic receptors in order to test whether the CAPN-dependent repression of autophagy represents a hallmark of chemotaxis.

Chemotactic receptors engage signaling pathways that coordinate the formation of adhesion complexes at the cell front. We found here that induction of this process through UTS2R or CXCR4 activation was dependent on the repression of autophagy since *i)* formation of adhesions was totally blocked by pharmacological inhibition of CAPNs or overexpression of ATG5, and *ii)* the effect of chemokines on adhesions was mimicked by siRNA targeting of *ATG5*. Several proteins involved in formation of adhesions were found to localize in autophagosomes. In particular, the SRC kinase, an essential protein for integrin signaling, rapidly shuttles from focal adhesions to autophagosomes when inducing cell-matrix detachment.[30] Proteomic profiling also identified RHOB as an autophagosome-associated protein in a pancreatic tumor cell line.[72] RHOB is a small GTPase that has recently been described as a key player in cell adhesion and directional migration. Indeed, Vega et al.[73] demonstrated that RHOB stabilizes lamellipodial protrusions by increasing ITGB1 (integrin subunit β 1) surface levels and activity, and that RHOB-depleted cells have impaired directional migration in a chemotactic gradient of serum.[73,74] Recently, autophagic activity has been shown to be essential for selective degradation of adhesion proteins such as PXN, VCL and ZYX.[28,31] More specifically, Kenific et al.[31] found that the GFP-LC3B protein colocalized with focal adhesions primarily during disassembly. It can therefore be envisaged that inhibition of autophagy by chemotactic GPCRs may act as a master switch that prevents autophagic degradation of key proteins involved in the formation/maturation of adhesion complexes and/or directional migration. Further work is needed to understand how, mechanistically, these proteins could be targeted to autophagy degradation. If membrane-associated, proteins involved in cell adhesions could be internalized in early endosomes, which could later fuse with mature autophagosomes.[75] Alternatively, cell-adhesion components could specifically associate with ATG16L1-containing pre-autophagosomal vesicles

and thus be targeted to the growing phagophore. In this scenario, inhibition of the formation of pre-autophagosomal vesicles by chemotactic GPCRs could increase the localization of cell-adhesion proteins at the cell front and in this manner directly participate in the growth and stabilization of the lamellipodium. It is interesting to note that a proteomic analysis of ATG16L1-positive precursor vesicles already identified proteins (CTTN [cortactin], CFL1 [cofilin 1]) involved in actin dynamics and lamellipodium expansion.[23]

Global inhibition of autophagosome biogenesis using interfering RNAs against ATG proteins results in increased focal adhesion size and reduced migration rate.[28,31] Although these migration studies could appear to conflict with our present data, indicating that autophagy inhibition by CXCR4 or UTS2R stimulates migration, they actually stress the fact that efficient chemotactic migration may imply compartmentalized rather than general inhibition of the autophagy machinery. It can therefore be proposed that activation of chemotactic GPCRs at the front of polarized cells would allow, through inhibition of autophagy, the efficient formation of adhesion complexes, while autophagy would still remain active at a distance from the sites of GPCR activation/signaling in order to enable focal adhesion disassembly. Caution should thus be taken in the interpretation of migration studies using interfering RNAs targeting ATG proteins. Global inhibition of autophagy using this method may indeed reflect the effects of cell exposure to a homogeneous rather than a gradient concentration of chemokine, i.e. induction of numerous, large and unproductive focal adhesions at the entire cell periphery that blunt migration. Demonstration of a compartmentalized regulation of autophagy in cells exposed to a gradient of ligand may require dynamic imaging of forming ATG5-ATG16L1-containing pre-autophagosomal endosomes, as previously investigated.[21]

Additional autophagy-related mechanisms may amplify the pro-migratory properties of CXCR4 and UTS2R. We found that inhibition of the autophagic flux following treatments with CXCL12 or UTS2 induced, as expected, the cytosolic accumulation of the SQSTM1 protein. Through its LC3B-interacting region, SQSTM1 acts as a receptor protein that contributes to the autophagic degradation of various cargo, such as ubiquitinated protein aggregates[35] and mitochondria.[76] SQSTM1 has recently been shown to play a critical role in the migration processes. Indeed, SQSTM1 can directly bind to and prevent the proteasomal degradation of the transcription factor TWIST1,[25,77] a core regulator in both early embryonic morphogenesis and cancer metastasis.[78,79] Through this SQSTM1-TWIST1 axis, autophagy-defective cancer cells engage a transcriptional program, called the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), that strengthens their invasive phenotype.[25,77] Moreover, recent data obtained in glioblastoma indicate that autophagy inhibition, through the knockdown of *ATG5* or *ATG7*, stimulates the expression of the EMT regulators SNAI1/SNAIL and SNAI2/SLUG,[80] as well as cell invasion. It can therefore be envisaged that inhibition of autophagy by chemotactic GPCRs contributes to EMT-like events during tumor progression. Further studies will be needed to address this point.

In summary, data from this study indicate that, in addition to extracellular nutrients such as amino acids, detection of extracellular guidance cues by GPCRs can tightly control autophagic activity in order to optimize lamellipodial adhesions and chemotactic migration. Based on the numerous studies highlighting a key role of the CXCL12-CXCR4 and UTS2-UTS2R systems in cancer cell invasion,[4,7,11,12,81] and on the well-characterized action of the CXCL12-CXCR4 axis during immune response,[82] our data may have broad implications and may help to envisage new therapeutic strategies for cancer or immunological disorders.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Antibodies were as follows: mouse monoclonal anti-SQSTM1/p62 (Abcam, AB56416), mouse monoclonal anti-VCL/vinculin (Sigma-Aldrich, V9264), mouse monoclonal anti-FLAG (Sigma-Aldrich, F1804), mouse monoclonal anti-MYC (Santa Cruz Biotechnology, sc-40), rabbit polyclonal anti-ATG16L1 (Cell Signaling Technology, 8089), sheep polyclonal anti-CDH2/cadherin 2 (R&D Systems, AF6426). Secondary antibodies used were Alexa Fluor 488-conjugated antibody against mouse IgG (Invitrogen, A21202), Alexa Fluor 488-conjugated antibody against rabbit IgG (Invitrogen, A21206), and Alexa Fluor 633-conjugated antibody against sheep IgG (Invitrogen, A21100). Other reagents in this study were 3-methyladenine (3-MA; Sigma-Aldrich, M9281), human UTS2 (Polypeptide Laboratories, SC1355), human CXCL12 (Bio-Techne, 350-NS-050), N-acetyL-Leu-Leu-Norleu-al (ALLN; Sigma-Aldrich, A6186), chloroquine (Sigma-Aldrich, C6628), DAPI (Invitrogen, D3571), Dynasore (Sigma-Aldrich, D7693), hematoxilin (Sigma-Aldrich, HHS32), ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid (EGTA; Sigma-Aldrich, E4378), FN1/fibronectin (Sigma-Aldrich, F0895), Mowiol (Merck Millipore, 475904), normal donkey serum (Sigma-Aldrich, D9663), paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, 252549), PP242 (Sigma-Aldrich, P0037), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Sigma-Aldrich, D1408), and Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T9284).

Plasmid constructs and small interfering RNA (siRNA)

The expression vector encoding the fusion protein EGFP-LC3B (24920, deposited by Toren Finkel) and the expression vectors encoding the fusion proteins Flag-CAPN1 and Flag-CAPN2 (60941 and 60942, deposited by Yi Zhang) are available from Addgene. The expression vector encoding the fusion protein hrGFP-WIPI1 was obtained by PCR amplification of cDNA prepared from HEK-293 cells, using the *WIPI1* specific primers 5′-GATCCTCGAGCGATGGAGGCCGAGGCCGC-3′ and 5′-GATCGAATTCTCATGACTGCTTCGTTTTGCCC-3′. The PCR fragment was subsequently digested with XhoI (Promega Corporation, R6161) and EcoRI (Promega Corporation, R6011), and cloned in-frame with humanized recombinant GFP in the phrGFP-N1 expression vector (Agilent Technologies, 240145). The expression vector encoding human ATG5 was obtained by PCR amplification of cDNA

prepared from HEK-293 cells, using the *ATG5*-specific primers 5′-GATCGGATCCATGACAGATGACAAAGATGTGCT-3′ and 5′-GATCCTCGAGTCAATCTGTTGGCTGTGGGATG-3′. The PCR fragment was digested with BamHI (Promega Corporation, R6021) and XhoI, and cloned into pcDNA3.1+ (Invitrogen, V790-20). The expression vector encoding MYC-tagged human ATG5 was obtained by PCR amplification using the *ATG5*-specific primers 5′-GATCGTCGACCATGACAGATGACAAAGATGTGC-3′ and 5′-GATCCTCGAGTCAATCTGTTGGCTGTGGGATG-3′. The PCR fragment was digested with SalI (Promega Corporation, R6051) and XhoI, and cloned into pCMV-MYC-N (BD-Biosciences, PT3282-5). To produce the conjugation-defective ATG5 mutant ($ATG5^{K130R}$), the plasmid encoding MYC-ATG5 was mutated to replace Lys130 by Arg using the QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, 200523) using the specific primers 5′-TTTATGTCATGTATGAGAGAAGCTGATGCTTTA-3′ and 5′-TAAAGCATCAGCTTCTCTCATACATGACATAAA-3′). Human *CXCR4* and *UTS2R* cDNAs are inserted into the pCMV-MYC-N vector, in frame with the MYC epitope. For experiments utilizing the MYC-tagged ATG5 construct, we expressed untagged receptors by transfecting cells with pcDNA3.1+ vectors containing human *CXCR4* or *UTS2R* cDNAs. All constructs were verified by sequencing. Control (D-001810-03), *ATG5-1-4* (J-004374-07, J-004374-08, J-004374-09, J-004374-10), *CAPN1* (L-005799) and *CAPN2* (L-005804) siRNA were purchased from Dharmacon.

Cell culture and transfections

The multiform glioblastoma cell line U87-MG (WHO grade IV) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, HTB-14™). The HEK-293 cell line (ATCC, CRL1573™) was generously provided by Dr. L. Prézeau, C. Barrère and I. Bidaud (IGF, Montpellier, France). These cell lines were routinely maintained in our laboratory according to the instructions from ATCC. For all experiments, cells were cultured in either DMEM (Gibco, 41965-039), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, 10270-106) or HBSS (Gibco, 14025). Transient transfections were performed using either the Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza, VCA-1003) or FuGene HD (Promega Corporation, E2311) according to the manufacturer's protocol. For experiments done with siRNAs targeting *CAPN1* and *CAPN2*, HEK-293 cells were subject to 2 rounds of transfection in order to ensure adequate knockdown of the long-lived proteins CAPN1 and CAPN2.[83]

Immunocytochemistry and image analysis

Cells were fixed in paraformaldehyde (4%, 10 min), permeabilized with Triton X-100 (0.05%, 5 min) and blocked with normal donkey serum (2%, 1 h). Cells were incubated overnight with the appropriate primary antibody at 4°C followed by incubation for 2 h at room temperature with the appropriate secondary antibody. Cells were counterstained with DAPI (1 μg/mL, 10 min) to label nuclei, and imaged by confocal microscopy (Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope). Focal adhesions: in VCL-labeled cells, the number of focal adhesion complexes was calculated using a particle analysis plug-in after successive image treatment by ImageJ software. MYC-ATG5 and Flag-CAPN1/CAPN2 localization: the amount of immunoreactive signal localized at the plasma membrane was measured by defining a region of interest using the ImageJ software, and expressed as a ratio to whole-cell immunoreactivity. ATG16L1-positive structures: in ATG16L1-labeled cells, the number of ATG16L1-positive structures was assessed with the Imaris software (Bitplane), using the automated spot detection function.

Autophagy assays

Cyto-ID labeling and Flow cytometry: HEK-293 cells were harvested in Accutase solution (Merck Millipore, SF006), rinsed in DPBS and incubated for 30 min at room temperature in DMEM without phenol red, containing 5% fetal bovine serum and the fluorescent Cyto-ID probe (Cyto-ID® Autophagy detection kit; Enzo Life Sciences, ENZ-51031K200). After incubation, cells were washed and analyzed on a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) operated with the CellQuest software. hrGFP-WIPI1 and EGFP-LC3B redistribution: cells expressing either hrGFP-WIPI1 or EGFP-LC3B were fixed in paraformaldehyde (4 %, 10 min) and imaged by confocal microscopy (Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope). The number of hrGFP-WIPI1 and EGFP-LC3B dots was assessed using the Imaris software. SQSTM1/p62 accumulation: autophagic flux was assessed by immunocytochemical analysis of endogenous SQSTM1 levels as described above. The integrated densities obtained from the green channel in 20 different images were normalized to the number of nuclei (DAPI stained) and represent levels of the SQSTM1 protein.

Analysis of CAPN activity

CAPN activity was determined by using a fluorescent CAPN substrate, t-butoxycarbonyL-Leu-L-Met-chloromethylaminocoumarin (BOC-LM-CMAC; Molecular Probes, A6520). Cleavage by CAPNs of this substrate produces fluorescence with an emission maximum around 430 nm. Cells cultured on glass slides (Menzel-Gläser, 0985) were incubated with the fluorescent substrate (50 μM) for 20 min at 37°C. Cells were then fixed and imaged by confocal microscopy. The integrated densities per area obtained from 20 different images were normalized to the number of cells in the area and are representative of CAPN activity.

Migration assay

Cells (100,000/filter) were seeded on FN1 (fibronectin 1)-coated transwell filters (8-μm pores, 24 wells; Corning Incorporated, 3422). The gradient of ligands was generated by addition of CXCL12 or UTS2 in the lower chamber. After 24 h, cells on the upper surface of the filter were removed using a cotton swab. Cells that migrated onto the lower surface were fixed, stained with hematoxilin and filters were mounted on glass slides with Mowiol and randomly photographed with a Nikon microscope (Champigny-sur-Marne, France; 10 fields/

filter). Cells on photographic fields were counted by using the "Cell counter" plug-in of ImageJ software.

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM for each group of samples. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.00 software (GraphPad Software). Comparisons between 2 groups were performed using unpaired *t* test or Mann and Whitney test.

Abbreviations

3-MA	3-methyladenine
ACTB	actin β
BECN1	Beclin 1
CAPN1	calpain 1
CAPN2	calpain 2
CDH2	cadherin 2
CLTC	clathrin heavy chain
CQ	chloroquine
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
EGFP	enhanced green fluorescent protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
HBSS	Hanks balanced salt solution
GPCR	G protein-coupled receptor
hrGFP	humanized recombinant green fluorescent protein
MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 β
MTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
PICALM	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PtdIns3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PtdIns3P	phosphatidylinositol 3-phosphate
PtdIns(4,5)P_2	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PXN	paxillin
SQSTM1	sequestosome 1
VCL	vinculin
UTS2	urotensin 2
UTS2R	urotensin 2 receptor
WIPI1	WD repeat domain phosphoinositide interacting 1
ZYX	zyxin

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported by Inserm, Géfluc, TC2N network, the Ligue contre le Cancer Normandie, the French Agence Nationale de la Recherche and the University of Rouen. P.C. is recipient of a fellowship from the French ministry, and V.L.J. is recipient of a fellowship from Haute-Normandie.

References

[1] Lauffenburger D, Horwitz AF. Cell migration: A physically integrated molecular process. Cell 1996; 84:359-69; PMID:8608589; http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5

[2] Salcedo R, Zhang X, Young HA, Michael N, Wasserman K, Ma WH, Martins-Green M, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. Blood 2003; 102:1966-77; PMID:12791666; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-11-3400

[3] Tiveron MC, Cremer H. CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. Curr Opin Neurobiol 2008; 18:237-44; PMID:18644448; http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2008.06.004

[4] Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. Adv Cancer Res 2014; 124:31-82; PMID:25287686; http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1

[5] Gagliardi F, Narayanan A, Reni M, Franzin A, Mazza E, Boari N, Bailo M, Zordan P, Mortini P. The role of CXCR4 in highly malignant human gliomas biology: Current knowledge and future directions. Glia 2014; 62:1015-23; PMID:24715652; http://dx.doi.org/10.1002/glia.22669

[6] Tan W, Martin D, Gutkind JS. The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. J Biol Chem 2006; 281:39542-9; PMID:17056591; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609062200

[7] Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet PO, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, et al. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. Oncogene 2015; 34:5080-94; PMID:25597409; http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.433

[8] Zhang YG, Li J, Li YG, Wei RH. Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. J Hypertens 2008; 26:1119-26; PMID:18475149; http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282fa1412

[9] Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S. Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. Tohoku J Exp Med 2009; 219:283-8; PMID:19966526; http://dx.doi.org/10.1620/tjem.219.283

[10] Segain JP, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Loirand G, Pacaud P. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. J Immunol 2007; 179:901-9; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.901

[11] Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccacieli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, et al. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. J Cell Biochem 2011; 112:341-53; PMID:21080343; http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22933

[12] Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, et al. Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. Eur J Clin Investig 2014; 44:285-94; PMID:24372535; http://dx.doi.org/10.1111/eci.12231

[13] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nat Cell Biol 2010; 12:814-22; PMID:20811353; http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-814

[14] Proikas-Cezanne T, Ruckerbauer S, Stierhof YD, Berg C, Nordheim A. Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. FEBS Letts 2007; 581:3396-404; PMID:17618624; http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.040

[15] Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci 2003; 116:1679-88; PMID:12665549; http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00381

[16] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after

processing. EMBO J 2000; 19:5720-8; PMID:11060023; http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720

[17] Mizushima N, Yoshimorim T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. Cell 2010; 140:313-26; PMID:20144757; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028

[18] Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol 2008; 182:685-701; PMID:18725538; http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200803137

[19] Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. Nat Cell Biol 2009; 11:1433-7; PMID:19898463; http://dx.doi.org/10.1038/ncb1991

[20] Hailey DW, Kim PK, Satpute-Krishnan P, Rambold AS, Sougrat R, Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell 2010; 141:656-67; PMID:20478256; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.009

[21] Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre- autophagosomal structures. Cell 2010; 12:747-57

[22] Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. Cell 2013; 154:1285-99; PMID:24034251; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.044

[23] Morozova K, Sidhar S, Zolla V, Clement CC, Scharf B, Verzani Z, Diaz A, Larocca JN, Hajjar KA, Cuervo AM, et al. Annexin A2 promotes phagophore assembly by enhancing Atg16L+ vesicle biogenesis and homotypic fusion. Nat Commun 2015; 6:5856-66; PMID:25597631; http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6856

[24] Tuloup-Minguez V, Hamaï A, Greffard A, Nicolas V, Codogno P, Botti J. Autophagy modulates cell migration and β1 integrin membrane recycling. Cell Cycle 2013; 12:3317-28; PMID:24036548; http://dx.doi.org/10.4161/cc.26298

[25] Qiang L, He YY. Autophagy deficiency stabilizes TWIST1 to promote epithelial-mesenchymal transition. Autophagy 2014; 10:1864-5; PMID:25126736; http://dx.doi.org/10.4161/auto.32171

[26] Lan SH, Wu SY, Zuchini R, Lin XZ, Su IJ, Tsai TF, Lin YJ, Wu CT, Liu HS. Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. Hepatology 2014; 59:505-17; PMID:23913306; http://dx.doi.org/10.1002/hep.26659

[27] 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 2014; 10:201-8; PMID:24300375; http://dx.doi.org/10.4161/auto.27198

[28] Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, Zamora M, Mui S, Macleod KF. Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3. Cell Reports 2016; 15:1660-72; PMID:27184837; http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.065

[29] 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; PMID:22732841; http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.92

[30] Sandilands E, Serrels B, McEwan DG, Morton JP, Macagno JP, McLeod K, Stevens C, Brunton VG, Langdon WY, Vidal M, et al. Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. Nat Cell Biol 2012; 14:51-60; http://dx.doi.org/10.1038/ncb2386

[31] Kenific CM, Stehbens SJ, Goldsmith J, Leidal AM, Faure N, Ye J, Wittmann T, Debnath J. NBR 1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. J Cell Biol 2016; 212:577-90; PMID:26903539; http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201503075

[32] Chan LLY, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, Kuksin D, Lin B, Qiu J. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. Autophagy 2012; 8:1371-82; PMID:22895056; http://dx.doi.org/10.4161/auto.21028

[33] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy 2008; 4:151-75; PMID:18188003; http://dx.doi.org/10.4161/auto.5338

[34] Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. Methods Enzymol 2009; 452:1-12; PMID:19200872; http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03601-X

[35] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem 2007; 282:24131-45; PMID:17580304; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M702824200

[36] Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. J Biol Chem 2008; 283:22847-57; PMID:18524774; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802182200

[37] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. J Cell Biol 2005; 171:603-14; PMID:16286508; http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200507002

[38] Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. PLOS Biol 2009; 7:0371-83; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000038

[39] Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. Dev Cell 2006; 10:839-50; PMID:16740485; http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002

[40] Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schüchner S, Ogris E, Kraft C, Martens S. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. EMBO J 2012; 31:4304-17; PMID:23064152; http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.278

[41] Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. Autophagy 2010; 6:764-76; PMID:20639694; http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.6.12709

[42] Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer JL, Jimenez-Sanchez M, Bento CF, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, et al. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. Nat Commun 2014; 5:4998-5016; PMID:25241929; http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5998

[43] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat Cell Biol 2006; 8:1124-32; PMID:16998475; http://dx.doi.org/10.1038/ncb1482

[44] Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D, Yuan J. Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. Autophagy 2010; 6:61-6; PMID:19901552; http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.1.10326

[45] Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. Cell Metabolism 2010; 11:467-78; PMID:20519119; http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.005

[46] Norman JM, Cohen GM, Bampton ETW. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. Autophagy 2010; 6:1042-56; PMID:21121091; http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.8.13337

[47] Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. J Cell Sci 2005; 118:3829-38; PMID:16129881; http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02562

[48] Lysko DE, Putt M, Golden JA. SDF1 reduces interneuron leading process branching through dual regulation of actin and microtubules. J Neurosci 2014; 34:4941-62; PMID:24695713; http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4351-12.2014

[49] Leloup L, Shao H, Bae YH, Deasy B, Stolz D, Roy P, Wells A. M-calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. J Biol Chem 2010; 285:33549-66; PMID:20729206; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.123604

[50] Shao H, Chou J, Baty CJ, Burke NA, Watkins SC, Stolz DB, Wells A. Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. Mol Cell Biol 2006; 26:5481-96; PMID:16809781; http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02243-05

[51] Nuzzi PA, Senetar MA, Huttenlocher A. Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. Mol Biol Cell 2007; 18:795-805; PMID:17192410; http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-09-0876

[52] Saraiva N, Prole DL, Carrara G, Johnson BF, Taylor CW, Parsons M, Smith GL. HGAAP promotes cell adhesion and migration via the stimulation of store-operated ca2+ entry and calpain 2. J Cell Biol 2013; 202:699-713; PMID:23940116; http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201301016

[53] Yang S, Chen J, Jiang X, Wang Q, Chen Z, Zhao W, Feng Y, Xin R, Shi J, Bian X. Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor. Biochem Biophys Res Commun 2005; 335:523-8; PMID:16084492; http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.113

[54] Wauson EM, Dbouk HA, Ghosh AB, Cobb MH. G protein-coupled receptors and the regulation of autophagy. Trends Endocrinol Metab 2014; 25:274-82; PMID:24751357; http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.006

[55] Foster SR, Roura E, Thomas WG. Extrasensory perception: odorant and taste receptors beyond the nose and mouth. Pharmacol Ther 2014; 142:41-61; PMID:24280065; http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.11.004

[56] Wauson EM, Zaganjor E, Lee AY, Guerra ML, Ghosh AB, Bookout AL, Chambers CP, Jivan A, McGlynn K, Hutchison MR, et al. The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy. Mol Cell 2012; 47:851-62; PMID:22959271; http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.001

[57] Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, Allen AM, Harrap SB, Thomas WG, Delbridge LMD. Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. Hypertension 2009; 53:1032-40; PMID:19433781; http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.128488

[58] Yadav A, Vallabu S, Arora S, Tandon P, Slahan D, Teichberg S, Singhal PC. ANG II promotes autophagy in podocytes. Am J Cell Physiol 2010; 299:488-96; http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00424.2009

[59] Yu KY, Wang YP, Wang LH, Jian Y, Zhao XD, Chen JW, Murao K, Zhu W, Dong L, Wang GQ, et al. Mitochondrial KATP channel involvement in angiotensin II-induced autophagy in vascular smooth muscle cells. Basic Res Cardiol 2014; 109:416-31; PMID:24847907; http://dx.doi.org/10.1007/s00395-014-0416-y

[60] Moreau K, Ravikumar B, Renna M, Puri C, Rubinsztein DC. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. Cell 2011; 146:303-17; PMID:21784250; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.023

[61] Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, Otomo T. Structure of the human ATG12-ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. Nat Struct Mol Biol 2013; 20:59-66; PMID:23202584; http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2431

[62] Kim JH, Hong SB, Lee JK, Han S, Roh KH, Lee KE, Kim YK, Choi EJ, Song HK. Insights into autophagosome maturation revealed by the structures of ATG5 with its interacting partners. Autophagy 2015; 11:75-87; PMID:25484072; http://dx.doi.org/10.4161/15548627.2014.984276

[63] Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, Jahreiss L, Fleming A, Pask D, Goldsmith P, O'Kane CJ, Floto RA, Rubinsztein DC. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. Nat Chem Biol 2008; 4:295-305; PMID:18391949; http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.79

[64] Rudinskiy N, Grishchuk Y, Vaslin A, Puyal J, Delacourte A, Hirling H, Clarke PGH, Luthi-Carter R. Calpain hydrolysis of α- and β2-adaptins decreases clathrin-dependent endocytosis and may promote neurodegeneration. J Biol Chem 2009; 284:12447-58; PMID:19240038; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M804740200

[65] Ando K, Brion JP, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, Chanut A, Lacor P, Lavaur J, Sazdovitch V, et al. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. Acta Neuropathologica 2013; 125:861-78; PMID:23589030; http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1111-z

[66] Kim JA, Kim HL. Cleavage of purified neuronal clathrin assembly protein (CALM) by caspase 3 and calpain. Exp Mol Med 2001; 33:245-50; PMID:11795487; http://dx.doi.org/10.1038/emm.2001.40

[67] Kim JS, Nitta T, Mohuczy D, O'Malley KA, Moldawer LL, Dunn WA Jr, Behrns KE. Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. Hepatology 2008; 47:1725-36; PMID:18311843; http://dx.doi.org/10.1002/hep.22187

[68] Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, Wells A. Epidermal growth factor receptor activation of calpain Is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. J Biol Chem 2000; 275:2390-8; PMID:10644690; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.4.2390

[69] Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. Mol Cell Biol 2004; 24:2499-512; PMID:14993287; http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.6.2499-2512.2004

[70] Shiraha H, Glading A, Chou J, Wells A, Jia Z. Activation of m-Calpain (Calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-Calpain. Mol Cell Biol 2002; 22:2716-27; PMID:11909964; http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.8.2716-2727.2002

[71] Su Y, Cui Z, Li Z, Block ER. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. FASEB J 2006; 20:1443-51; PMID:16816119; http://dx.doi.org/10.1096/fj.05-5354com

[72] Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. Nature 2014; 509:105-9; PMID:24695223; http://dx.doi.org/10.1038/nature13148

[73] Vega FM, Colomba A, Reymond N, Thomas M, Ridley AJ. RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. Open Biol 2012; 2:120076-85; PMID:22724071; http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120076

[74] Ridley AJ. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. J Microscopy 2013; 251:242-9; PMID:23488932; http://dx.doi.org/10.1111/jmi.12025

[75] Razi M, Chan EYW, Tooze SA. Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. J Cell Biol 2009; 185:305-21; PMID:19364919; http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200810098

[76] Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nat Cell Biol 2010; 12:119-31; PMID:20098416; http://dx.doi.org/10.1038/ncb2012

[77] Qiang L, Zhao B, Ming M, Wang N, He TC, Hwang S, Thorburn A, He YY. Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:9241-6; PMID:24927592; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1322913111

[78] Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA, et al. Twist , a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell 2004; 117:927-39; PMID:15210113; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006

[79] Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, Yang J. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. Cancer Cell 2011; 19:372-86; PMID:21397860; http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.036

[80] Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, Faienza F, Esposito V, Limatola C, Cecconi F, et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. Mol Oncol 2015; 9:1612-25; PMID:26022108; http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2015.04.016

[81] Franco R, Zappavigna S, Gigantino V, Luce A, Cantile M, Cerrone M, Facchini G, Perdonà S, Pignata S, Lorenzo G Di, et al. Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility / invasion. J Exp Clin Cancer Res 2014; 33:1-10; PMID:24383517; http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-33-48

[82] Nagasawa T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. J Mol Med 2014; 92:433-9; PMID:24722947; http://dx.doi.org/10.1007/s00109-014-1123-8

[83] Zhang W, Lane RD, Mellgren RL. The major calpain isozymes are long-lived proteins. J Biol Chem 1996; 271:18825-30; PMID:8702541; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.31.18825

Supplementary methods

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Sigma-Aldrich, T9424) and purified on NucleoSpin® RNA II columns (Macherey-Nagel, 740955-250) according to the manufacturer's instructions. One µg of total RNA was used for cDNA synthesis using the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, A3800). cDNA samples were diluted 1:20 and real-time PCR was performed in a FAST SYBR green master mix (Applied Biosystems, 4472908) using the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). The fold change in expression of each target mRNA (*CAPN1*, *CAPN2* or *ATG5*) relative to *YWHAZ* mRNA was calculated based on the threshold cycle (Ct) as $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, where $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{YWHAZ}$, and $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control}$. *ATG5* sense and antisense primers: 5'-AAAGATGTGCTTCGAGATGTGT-3' and 5'-CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA-3'. *CAPN1* sense and antisense primers: 5'-GAAGCGTCCCACGGAACTG-3' and 5'-GTGCAGGAGGGTGTCGTTG-3'. *CAPN2* sense and antisense primers: 5'- GTTCTGGCAATACGGCGAGT-3' and 5'- CTTCGGCTGAATGCACAAAGA-3'. *YWHAZ* sense and antisense primers: 5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3' and 5'-CCGCCAGGACAAACCAGAT-3'.

SDS-PAGE and western blot.

Cell lysates were prepared in ice-cold Lysis Buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA [Sigma-Aldrich, E5134], 10% NP40 [Sigma-Aldrich, 74385], 1X protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich, S8820]), mixed with an equal volume of Laemmli buffer and loaded onto 10% SDS-PAGE gel. After separation, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Merck Millipore, IPVH00010). Membranes were blocked with 5% nonfat milk, incubated (overnight, 4°C) with the primary antibodies (anti-ATG5, Novus Biologicals, NB-110-53818; anti-CAPN1, Cell Signaling Technology, 2556; anti-CAPN2, Cell Signaling Technology, 2539) and then incubated (1 h, room temperature) with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against rabbit IgG (Santa

Cruz Biotechnology, sc-2004), or against mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005). Immunoreactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence western blotting substrate (GE Healthcare, 29018903). Equal loading was confirmed using anti-ACTB/actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778).

Supplementary Figure 1 - Coly *et al*.

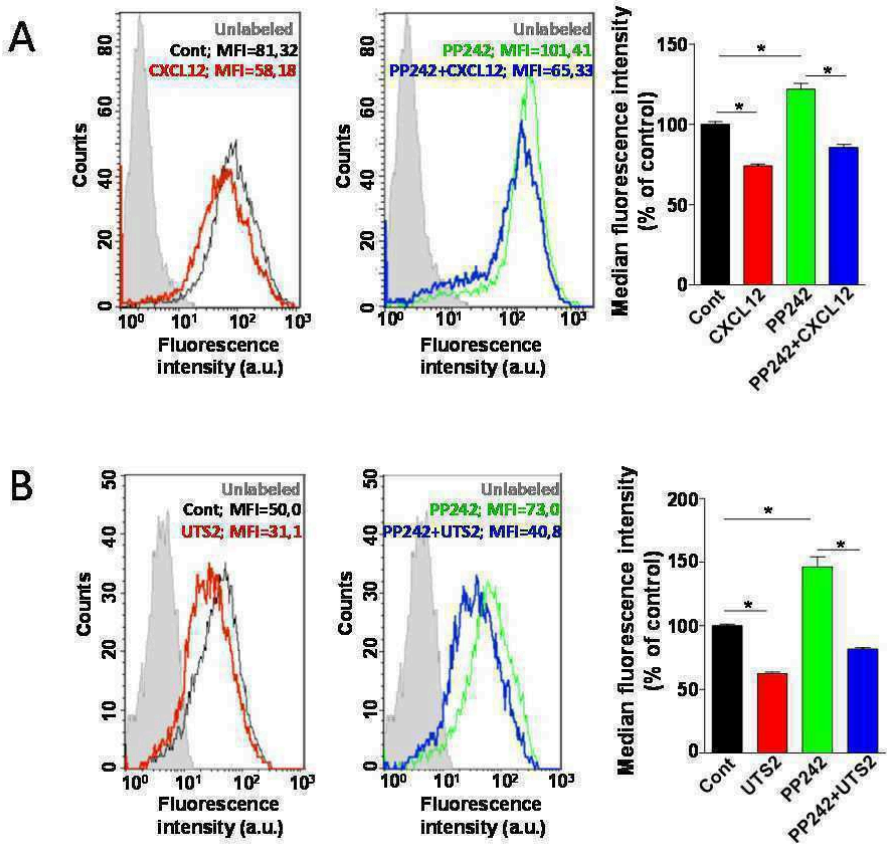


Figure S1. Activation of chemotactic GPCRs inhibits PP242-induced autophagy. HEK-293 cells expressing CXCR4 (**A**) or UTS2R (**B**) were treated with the appropriate ligand (CXCL12, 10^{-8} M; UTS2, 10^{-9} M), with or without PP242 (10^{-6} M), as indicated. After treatment, cells were incubated with the Cyto-ID autophagy dye and fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Data shown are representative samples of each experimental group (10,000 cells per sample). a.u., arbitrary units; MFI, median fluorescence intensity; unlabeled, background signal without Cyto-ID incubation. Histograms show the average MFI ± SEM (n=4; 10,000 cells per sample). Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test. *$P < 0.05$.

Supplementary Figure 2 - Coly *et al.*

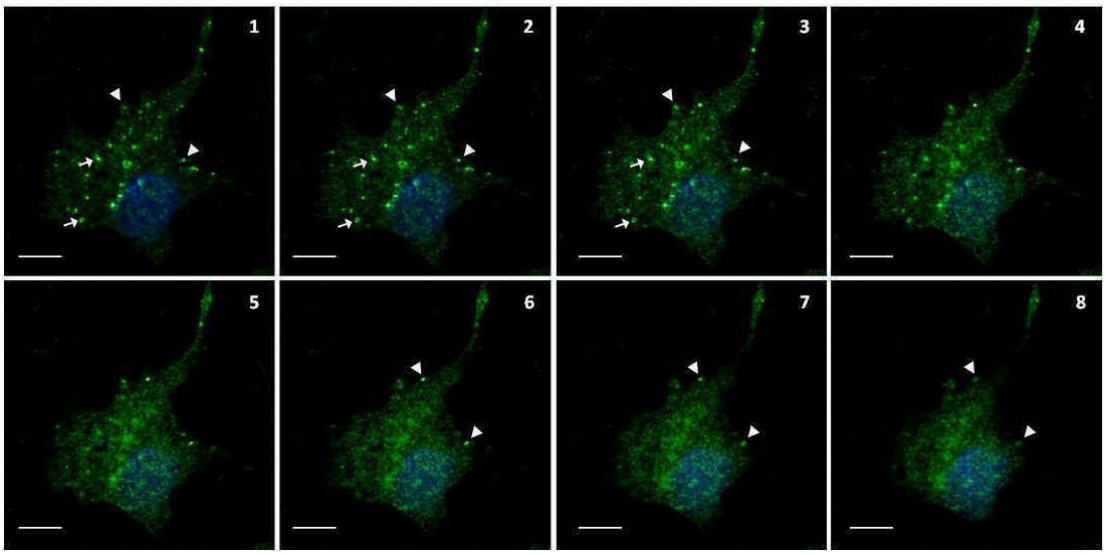


Figure S2. Z-axis 2-dimensional confocal analysis of ATG16L1 distribution following endocytosis inhibition. HEK-293 cells were treated with Dynasore (10^{-4} M) for 1 h, fixed and labeled with an anti-ATG16L1 antibody. Images show z-axis confocal analysis of a representative cell. Eight sections (frame interval: 0.24 µm) were taken from the ventral surface of the cell, which adheres to the substratum, to the upper surface. The bottom sections (numbered 1 to 3) show internal (arrows) and peripheral (arrowheads) ATG16L1 dots. Internal dots likely correspond to ATG16L1-positive endocytic structures locked at the ventral surface of the cell. The upper frames (6 to 8) do not display internal dots, but still show peripheral ATG16L1-positive dots (arrowheads) localized at the plasma membrane. Scale bars: 10 µm.

Supplementary Figure 3 - Coly *et al*.

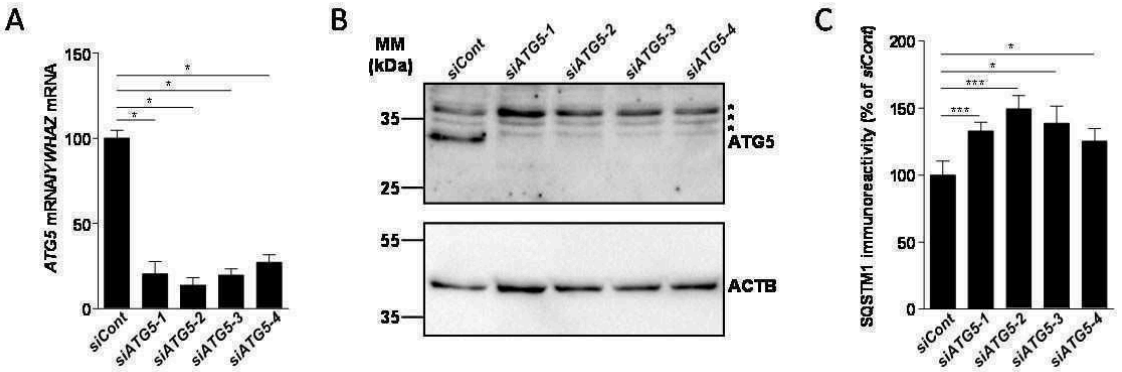


Figure S3. siRNA knockdown of *ATG5*. HEK-293 cells were transfected with 1 of the 4 siRNAs targeting *ATG5* (*siATG5-1, siATG5-2, siATG5-3, siATG5-4*) or nontargeting siRNA (*siCont*). Experiments were performed 24 h after transfection. (**A**) RT-qPCR analysis of *ATG5* mRNA levels. Data show means ± SEM (n=4). (**B**) Western blot analysis of ATG5 protein levels. The blot was stripped and reprobed with an anti-ACTB antibody. Asterisk, nonspecific bands. MM, molecular mass. (**C**) Cells were fixed and labeled with an anti-SQSTM1/p62 antibody. For each photographic field, SQSTM1 immunoreactivity was quantified and normalized to the number of nuclei. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test. *$P < 0.05$; ***$P < 0.001$.

Supplementary Figure 4 - Coly *et al*.

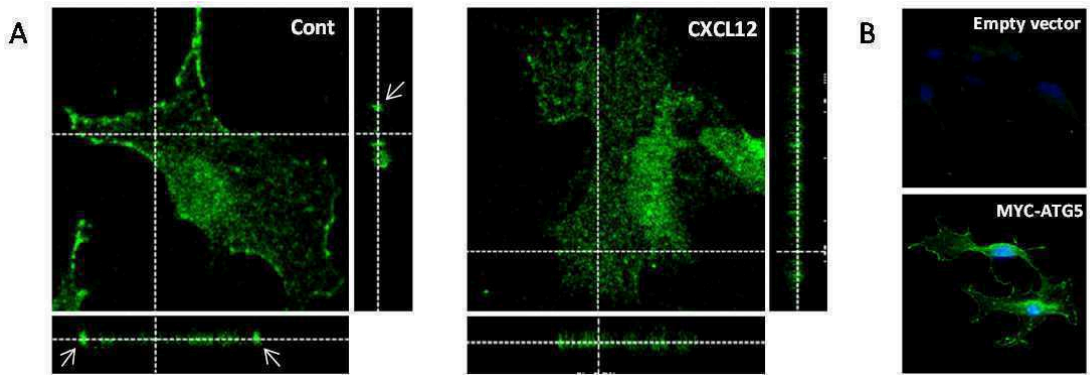


Figure S4. Activation of CXCR4 reduces the pool of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane. (**A**) Z-axis confocal analysis of MYC-ATG5 signal. HEK-293 cells expressing CXCR4 and MYC-ATG5 were placed in DMEM for 1 h with our without CXCL12 (10^{-8} M), fixed and labeled with an anti-MYC antibody. Images show z-axis confocal analyses of representative cells. Ninety-three sections (frame interval: 0.12 µm) were taken from the ventral surface of the cell, which adheres to the substratum, to the upper surface. Orthogonal views of z-stacks are presented on the bottom and right sides of each image. In control conditions, high spikes in fluorescent signal intensity are observed at the cell periphery (arrows). (**B**) Validation of anti-MYC antibody specificity. HEK-293 cells were transfected either with an empty vector or with a vector encoding MYC-ATG5. Cells were then fixed and labeled with an anti-MYC antibody.

Supplementary Figure 5 - Coly *et al*.

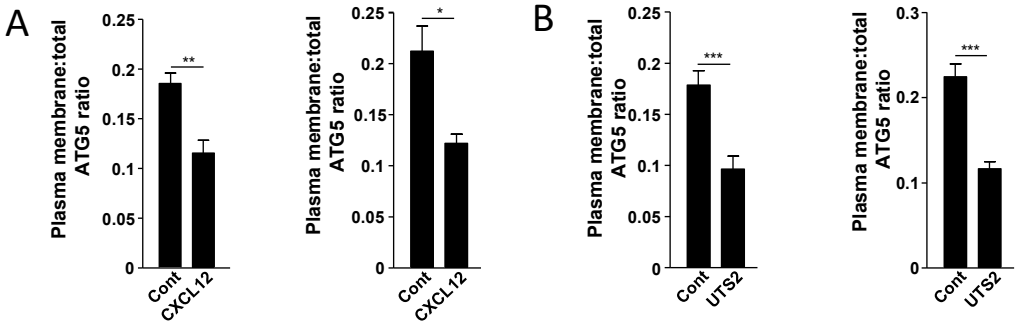


Figure S5. Chemotactic GPCR activation reduces ATG5 pools at the plasma membrane, in either rich or starvation medium. (**A**) HEK-293 cells expressing MYC-ATG5 together with CXCR4 were either kept in DMEM with 10% serum (*left panel*) or placed in HBSS (*right panel*) for 1 h with or without CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and labeled with an anti-MYC antibody. For each photographic field, the fraction of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. (**B**) HEK-293 cells expressing MYC-ATG5 together with UTS2R were either kept in DMEM with 10% serum (*left panel*) or placed in HBSS (*right panel*) for 1 h with or without UTS2 (10^{-9} M). Cells were fixed and labeled with an anti-MYC antibody. For each photographic field, the fraction of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.

Supplementary Figure 6 - Coly *et al*.

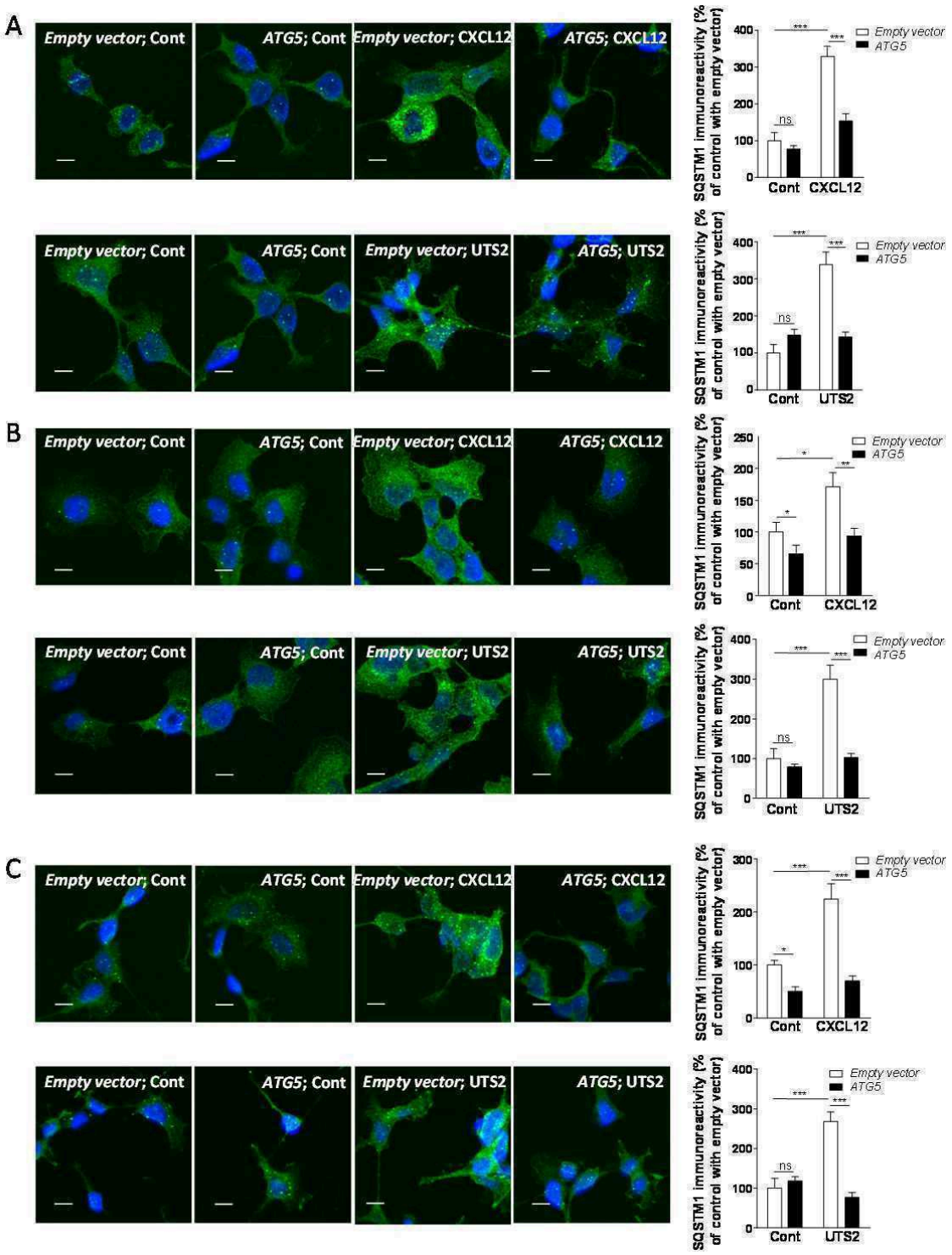


Figure S6. Overexpression of ATG5 blocks CXCR4- and UTS2R-induced SQSTM1 accumulation. (**A**) HEK-293 cells were transfected with either *CXCR4* (*upper panels*) or *UTS2R* (*lower panels*), together with *ATG5* or an empty vector. Cells were placed in DMEM without serum for 6 h, with or without CXCL12 (10^{-8} M; *upper panels*) or UTS2 (10^{-9} M; *lower panels*), then fixed and labeled with an anti-SQSTM1/p62 antibody (green). For each photographic field, SQSTM1 immunoreactivity was

quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. (**B**) HEK-293 cells were transfected with either *CXCR4* (*upper panels*) or with *UTS2R* (*lower panels*), together with *ATG5* or an empty vector. Cells were kept in rich medium (DMEM with 10% serum) and treated for 6 h, with or without CXCL12 (10^{-8} M; *upper panels*) or UTS2 (10^{-9} M; *lower panels*). Cells were fixed and SQSTM1 immunoreactivity was measured as in (**A**). (**C**) HEK-293 cells were transfected either with *CXCR4* (*upper panels*) or with *UTS2R* (*lower panels*) together with *ATG5* or an empty vector. Cells were placed for 6 h in starvation medium (HBSS), with or without CXCL12 (10^{-8} M; *upper panels*) or UTS2 (10^{-9} M; *lower panels*). Cells were fixed and SQSTM1 immunoreactivity was measured as in (**A**). Statistical significance was evaluated in all experiments using Mann and Whitney test. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$; ns, not statically different. Scale bars: 10 µm.

Supplementary Figure 7 - Coly *et al*.

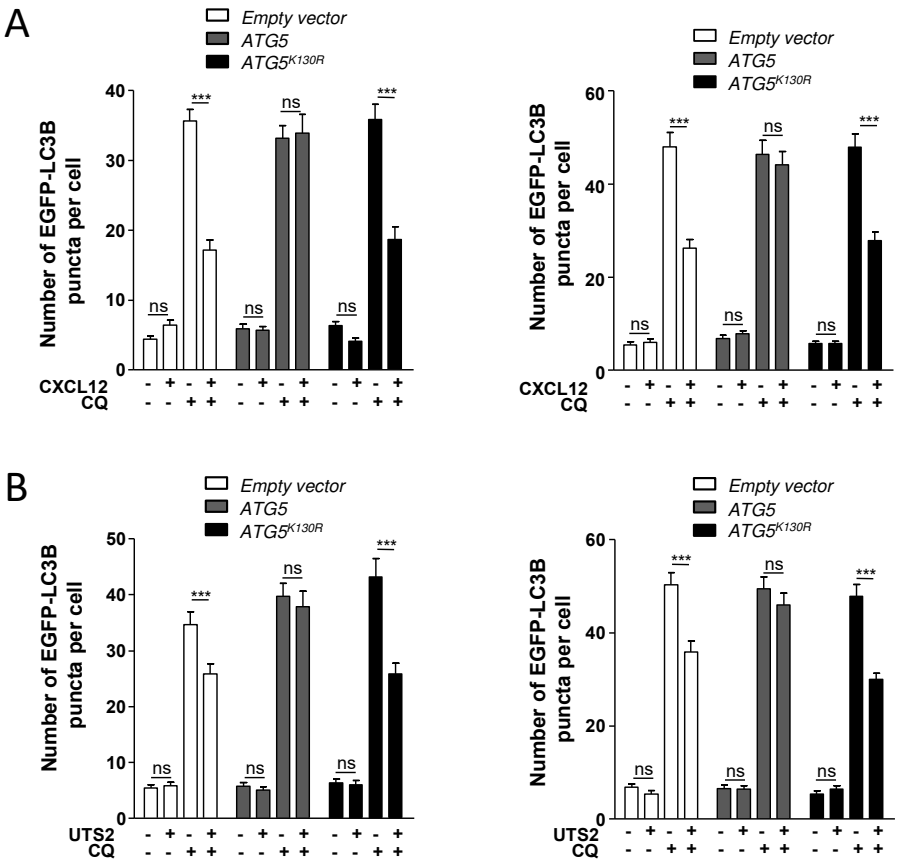


Figure S7. Overexpression of ATG5 blocks the inhibitory effects of chemotactic GPCRs on the biogenesis of autophagosomes. (**A**) HEK-293 cells were transfected with *EGFP-LC3B*, together with *CXCR4* and either *ATG5*, the $ATG5^{K130R}$ mutant or an empty vector. Cells were either kept in rich medium (DMEM with 10% serum; *left panel*) or placed in starvation medium (HBSS; *right panel*) for 6 h with or without chloroquine (CQ; $5x10^{-5}$ M) and CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (**B**) HEK-293 cells were transfected with *EGFP-LC3B*, together with *UTS2R* and either *ATG5*, the $ATG5^{K130R}$ mutant or an empty vector. Cells were either kept in rich medium (DMEM with 10% serum; *left panel*) or placed in starvation medium (HBSS; *right panel*) for 6 h with or without chloroquine (CQ; $5x10^{-5}$ M) and UTS2 (10^{-9} M). Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (**A**). Statistical significance was evaluated using unpaired *t*-test. ***$P < 0.001$; ns, not statically different.

Supplementary Figure 8 - Coly *et al*.

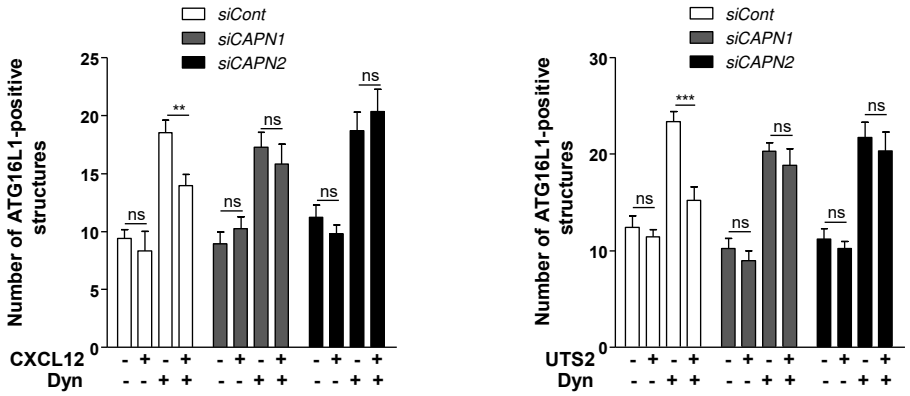


Figure S8. The effect of chemotactic GPCRs on ATG16L1 localization depends on CAPN1 and CAPN2. HEK-293 cells were transfected with *CXCR4* (*left panel*) or *UTS2R* (*right panel*), together with either siRNA targeting *CAPN1* (*siCAPN1*), *CAPN2* (*siCAPN2*) or nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were starved for 1 h in HBSS in the absence or presence of Dynasore (*Dyn*; 10^{-4} M) and CXCL12 (10^{-8} M, *left panel*) or UTS2 (10^{-9} M, *right panel*), as indicated. Cells were fixed and labeled with an anti-ATG16L1 antibody. For each photographic field, the number of ATG16L1-positive structures was quantified and normalized to the number of nuclei. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; ns, not statically different.

Supplementary Figure 9 - Coly *et al*.

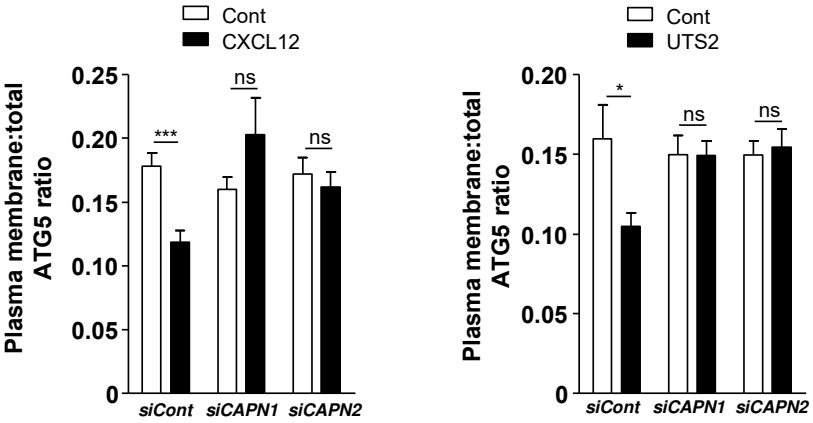


Figure S9. The effect of chemotactic GPCRs on ATG5 localization depends on CAPN1 and CAPN2. HEK-293 cells were transfected with *MYC-ATG5* together with *CXCR4* (*left panel*) or *UTS2R* (*right panel*) and either siRNA targeting *CAPN1* (*siCAPN1*), *CAPN2* (*siCAPN2*) or nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were placed in DMEM without serum for 1 h in the absence or presence of CXCL12 (10^{-8} M; *left* panel) or UTS2 (10^{-9} M; *right panel*). Cells were fixed and labeled with an anti-MYC antibody. For each photographic field, the fraction of MYC-ATG5 protein localized at the plasma membrane was evaluated. Data represent means ± SEM from 15 photographic fields per group. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test. *$P < 0.05$; ***$P < 0.001$; ns, not statically different.

Supplementary Figure 10 - Coly *et al*.

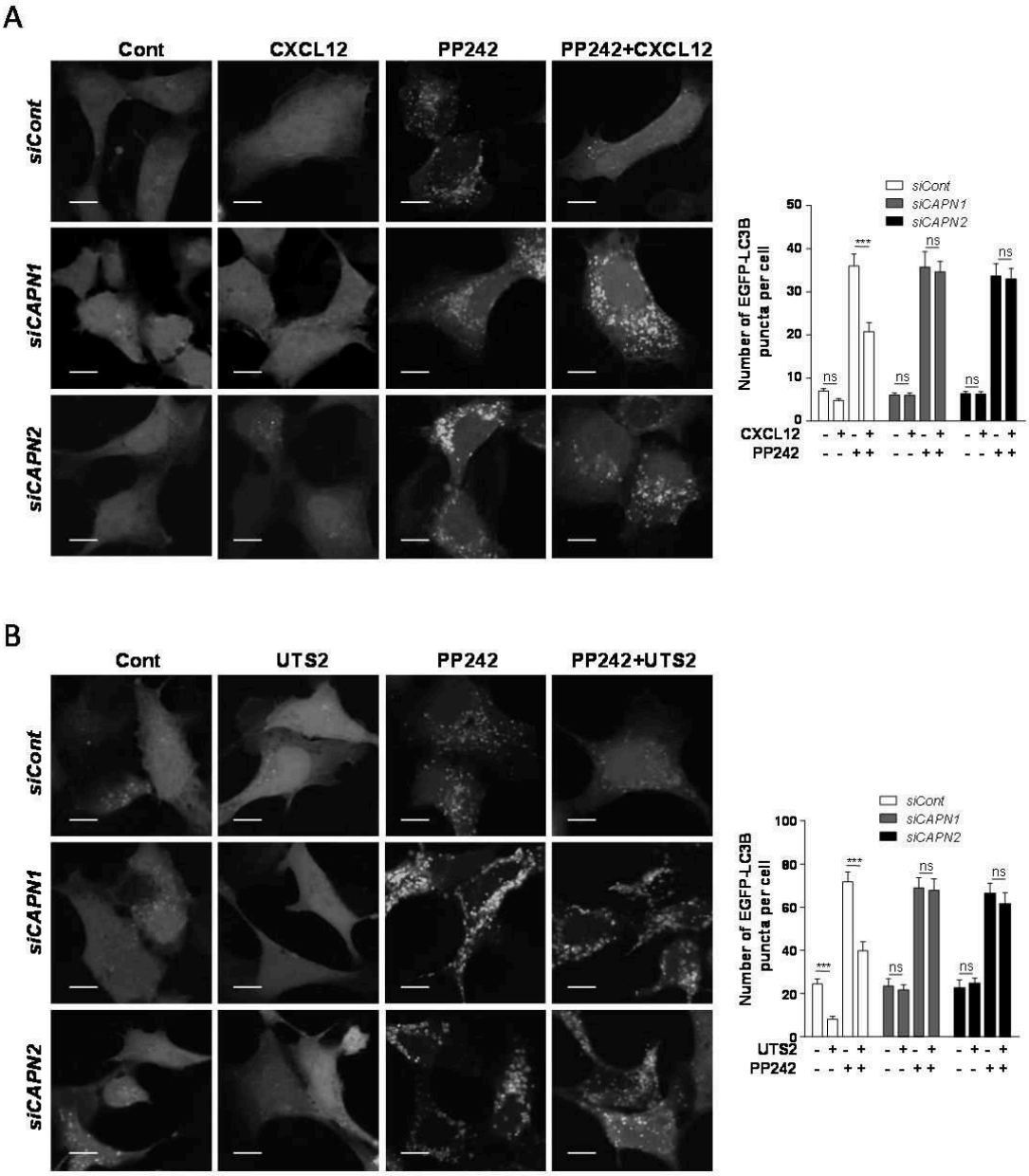


Figure S10. The inhibitory effect of chemotactic GPCRs on the formation of mature autophagosomes depends on CAPN1 and CAPN2. (**A**) HEK-293 cells expressing CXCR4 and the fluorescent protein EGFP-LC3B were transfected either with siRNA targeting *CAPN1* (*siCAPN1*), *CAPN2* (*siCAPN2*) or with nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were then treated for 6 h with or without CXCL12 (10^{-8} M) and PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified in confocal images. Data represent means ± SEM, from at least 100 cells per group. (**B**) HEK-293 cells expressing UTS2R and the fluorescent protein EGFP-LC3B were transfected either with siRNA targeting *CAPN1* (*siCAPN1*), *CAPN2* (*siCAPN2*) or with nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were then treated for 6 h with or without UTS2 (10^{-9} M) and PP242 (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and the number of EGFP-LC3B fluorescent dots per cell was quantified as in (**A**). Statistical significance was evaluated using the unpaired *t*-test. ***$P < 0.001$; ns, not statistically different. Scale bars: 10 µm.

Supplementary Figure 11 - Coly *et al*.

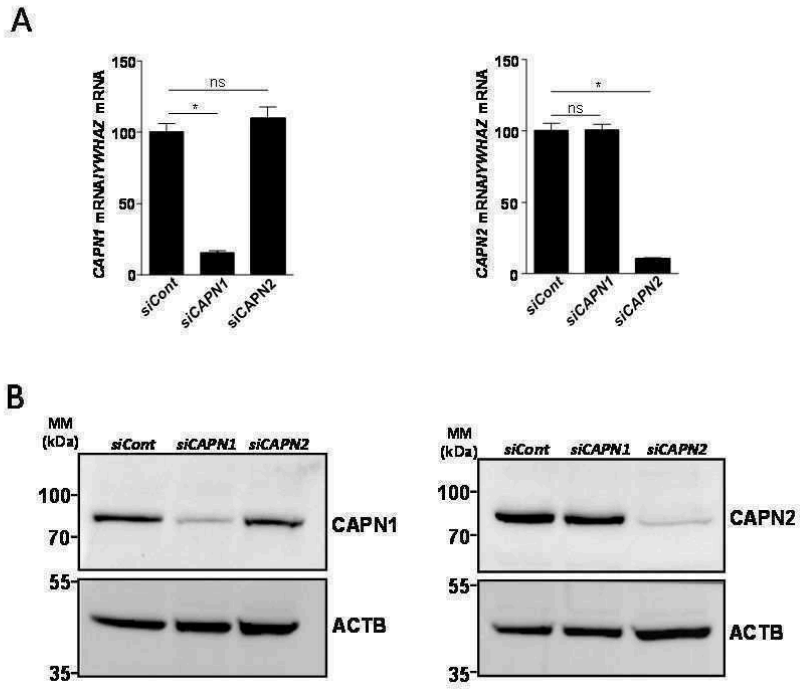


Figure S11. siRNA knockdown of *CAPN1* and *CAPN2*. In order to ensure adequate knockdown of the long-lived proteins CAPN1 and CAPN2,[83] HEK-293 cells were subject to 2 rounds of transfection with either siRNA targeting *CAPN1* (*siCAPN1*), siRNA targeting *CAPN2* (*siCAPN2*) or with nontargeting siRNA (*siCont*). Cells were harvested 24 h after the second transfection. (**A**) RT-qPCR analysis of *CAPN1* and *CAPN2* mRNA levels. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test. $*P < 0.05$; ns, not statistically different. (**B**) Western blot analysis of CAPN1 and CAPN2 protein levels. Blots were stripped and re-robed with an anti-ACTB antibody. MM, molecular mass.

Supplementary Figure 12 - Coly *et al*.

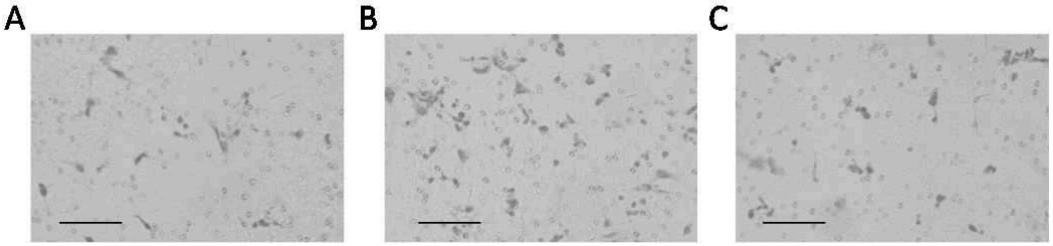


Figure S12. Illustration of a migration experiment using a transwell assay. Representative illustration of the experiment performed in Fig. 6A. Here is shown evaluation of the migration of HEK-293 cells expressing CXCR4 in the absence of CXCL12 (**A**), in the presence of CXCL12 in the lower chamber (**B**) or in the presence of CXCL12 (10^{-8} M) in both upper and lower chambers (**C**). At the end of the incubation, cells on the upper surface of the filter were removed, and cells that migrated onto the lower surface were fixed, stained with hematoxylin and counted. Scale bars: 100 µm. Quantifications presented in Fig. 6 correspond, for each experimental group, to the analysis of 10 photographic fields from 6 transwells.

Supplementary Figure 13- Coly *et al*.

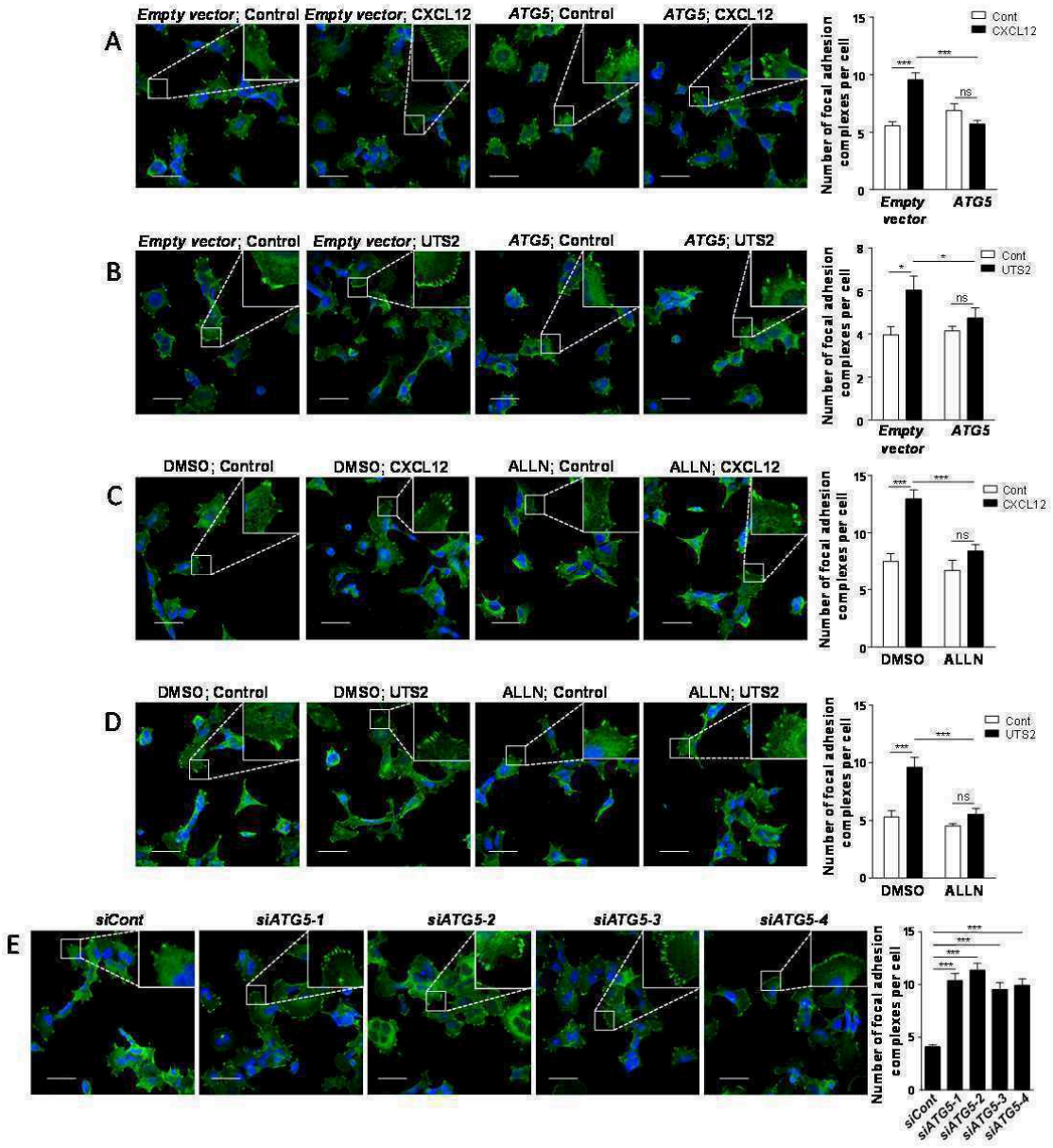


Figure S13. Inhibition of autophagy is required for CXCR4- or UTS2R-induced formation of adhesion complexes in rich medium. (**A**) HEK-293 cells were transfected with *CXCR4*, together with *ATG5* or an *empty vector*. Cells were then treated (1 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and adhesion complexes were labeled with an anti-VCL antibody (green). For each photographic field, adhesion complexes were quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means ± SEM from 15 fields per group. (**B**) HEK-293 cells were transfected with *UTS2R* together with *ATG5* or an empty vector. Cells were then treated (1 h) with or without UTS2 (10^{-9} M). Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). (**C**) HEK-293 cells expressing CXCR4 were treated (1 h) with or without CXCL12 (10^{-8} M) and ALLN (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). (**D**) HEK-293 cells expressing UTS2R were treated (1 h) with or without UTS2 (10^{-9} M) and ALLN (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). (**E**) HEK-293 cells were transfected with 1 of the 4 siRNAs targeting *ATG5* (*siATG5-1, siATG5-2, siATG5-3, siATG5-4*) or a nontargeting siRNA (*siCont*).

Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). Statistical significance was evaluated in all experiments using a Mann and Whitney test. ***P < 0.05; ****P < 0.001; ns, not statistically different. Scale bars: 50 µm.

Supplementary Figure 14 - Coly *et al*.

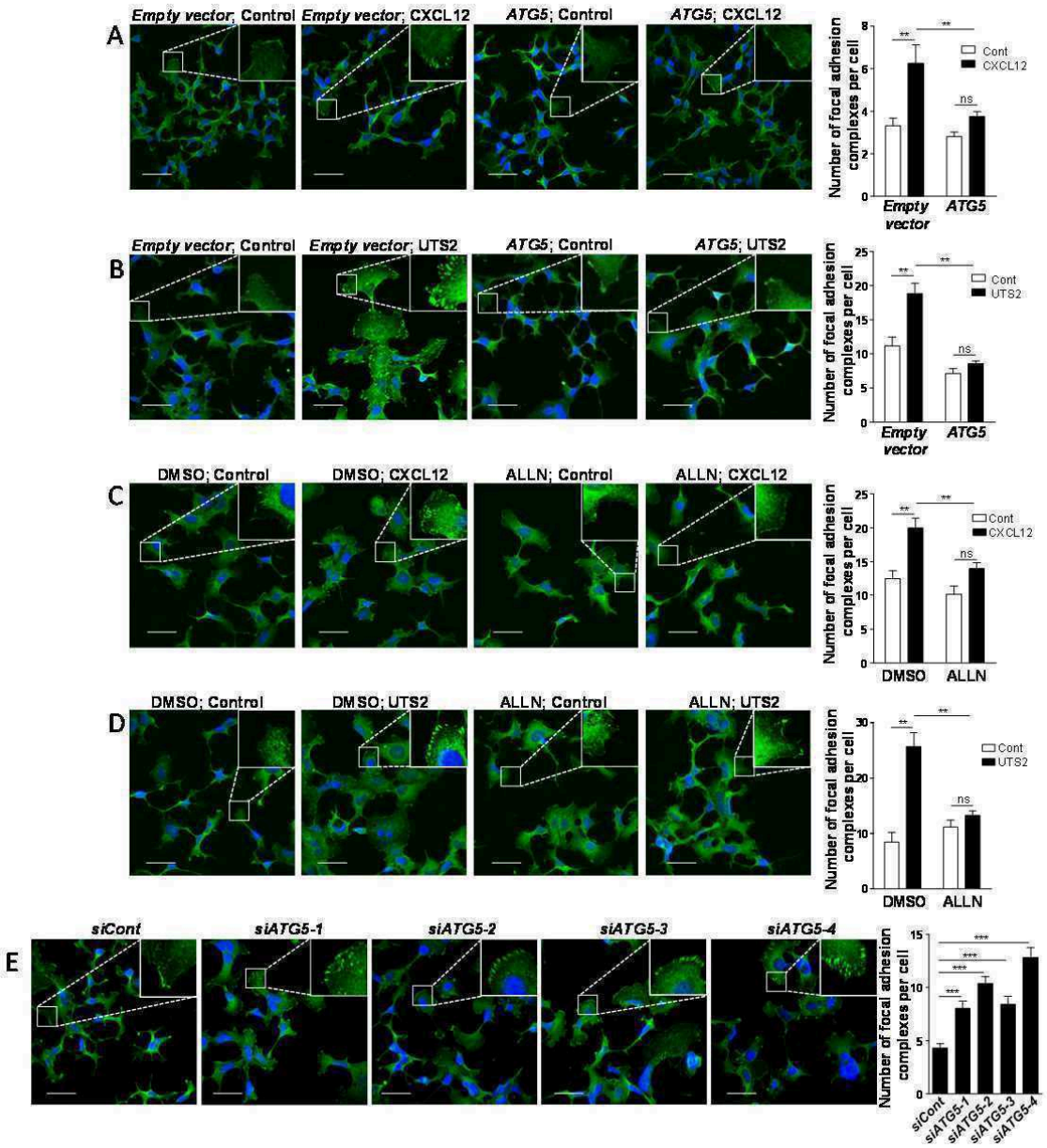


Figure S14. Inhibition of autophagy is required for CXCR4- or UTS2R-induced formation of adhesion complexes in starvation medium. (**A**) HEK-293 cells were transfected with *CXCR4*, together with *ATG5* or an empty vector. Cells were then placed (1 h) in starvation medium (HBSS) with or without CXCL12 (10^{-8} M). Cells were fixed and adhesion complexes were labeled with an anti-VCL antibody (green). For each photographic field, adhesion complexes were quantified and normalized to the number of nuclei (DAPI stained, blue). Data represent means ± SEM from 15 fields per group. (**B**) HEK-293 cells were transfected with *UTS2R* together with *ATG5* or an empty vector. Cells were then placed in starvation medium (HBSS) for 1 h with or without UTS2 (10^{-9} M). Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). (**C**) HEK-293 cells expressing CXCR4 were placed in starvation medium (HBSS) for 1 h with or without CXCL12 (10^{-8} M) and ALLN (10^{-6} M), as indicated. Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). (**D**) HEK-293 cells expressing UTS2R were placed in starvation medium (HBSS) for 1 h with or without (10^{-9} M) and ALLN (10^{-6} M), as indicated.

Cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). (**E**) HEK-293 cells were transfected with 1 of the 4 siRNAs targeting *ATG5* (*siATG5-1, siATG5-2, siATG5-3, siATG5-4*) or a nontargeting siRNA (*siCont*). After being placed in starvation medium (HBSS) for 1 h, cells were fixed and adhesion complexes were quantified as in (**A**). Statistical significance was evaluated in all experiments using a Mann and Whitney test. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0{,}001$; ns, not statistically different. Scale bars: 50 µm.

The autophagy machinery: a new player in chemotactic cell migration

Pierre-Michaël Coly, Pierrick Gandolfo, Hélène Castel and Fabrice Morin.

Dans cette revue, nous examinons les données de la littérature reliant la machinerie autophagique aux différentes étapes de la migration cellulaire. Après une présentation générale des deux processus, nous proposons un modèle selon lequel les RCPG chimiotactiques, *via* une inhibition compartimentée de l'activité autophagique, orienteraient le trafic de membranes et de protéines spécifiques vers l'avant de la cellule, afin de favoriser la migration directionnelle.

Frontiers in Neuroendocrine Science (soumis)

The autophagy machinery: a new player in chemotactic cell migration

Pierre-Michaël Coly[1,2], Pierrick Gandolfo[1,2], Hélène Castel[1,2] and Fabrice Morin[1,2]

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, 76000 Rouen, France.
[2]Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB) 76000 Rouen, France.

The authors declare no conflict of interest.

Running title: Autophagy and cell migration

Corresponding authors:

Dr Fabrice Morin, Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, Team Astrocyte and Vascular Niche, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France. Email: fabrice.morin@univ-rouen.fr

Tel: (33)235-146-630

Abstract word count: 104

Manuscript word count: 4522

Figure: 1

Abstract

Autophagy is a highly conserved self-degradative process that plays a key role in diverse cellular processes such as stress response or differentiation. A growing body of work highlights the direct involvement of autophagy in cell migration and cancer metastasis. Specifically, autophagy has been shown to be involved in modulating cell adhesion dynamics as well as epithelial-to-mesenchymal transition. After providing a general overview of the mechanisms controlling autophagosome biogenesis and cell migration, we discuss how chemotactic GPCRs, through the repression of autophagy, may orchestrate membrane trafficking and compartmentation of specific proteins at the cell front in order to support the critical steps of directional migration.

Abbreviations: CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor 4; DFC1, double FYVE domain-containing protein 1; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; GPCR, G protein-coupled receptor; LC3, microtubule associated protein 1 light chain 3; mTOR, mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase); NBR1, neighbor of BRCA1 gene 1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate; PIP3 phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate; UT, urotensin II receptor; WIPI, WD repeat domain phosphoinositide interacting.

Keywords: autophagosome biogenesis, cell adhesion, chemotactic migration, CXCR4, GPCR, urotensin II.

1. Chemotactic migration: control by G protein-coupled receptors

1.1. Steps of chemotactic migration

Chemotactic cell migration is a highly coordinated process that is crucial to the function of many cell types. As such, it is a fundamental property of a variety of physiological and pathological phenomena. Chemotactic migration is first observable during embryonic development, as sheets of cells undergo migration to form the different layers of the embryo and later, the different tissues that constitute organs.[1] Cell migration is also involved in immune response and angiogenesis allowing cells to infiltrate and navigate through tissues.[2] A few pathological processes can also take advantage of a cell's migration abilities to spread through the organism. This is the case in cancer progression, during which parenchyma invasion and metastasis formation heavily rely on chemotactic migration.[3]

Previous studies have shown that chemotactic migration can be broken down into a few successive steps. Surface receptors pick up on chemotactic cues in the extracellular environment and orient chemotaxis. These receptors can activate signalling cascades that establish a front-rear polarity. The class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is a vital player during this step. The lipid kinase forms phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) at the cell front, which serves as a signal for several pathways that converge towards reorganizing the actin cytoskeleton.[4] This allows the formation of actin-dependent membrane protrusions towards the chemotactic signal. The lamellipodium is probably the most characterized type of cell protrusion involved in migration. It is composed of a dense dendritic network of actin filaments that push the plasma membrane forward, but also serves as an intracellular scaffold to which the first links with the extracellular matrix (ECM) appear. These links, called adhesion complexes, stabilize the lamellipodium and act as a molecular clutch to allow the cell body to pull itself forward.[5]

Adhesion complexes are highly dynamic structures that are formed by the hierarchical recruitment of different scaffolding proteins. At their base we find integrins, heterodimer transmembrane proteins with long extracellular heads that can bind to ECM components such as fibronectin. This link, coupled with intracellular cues, activates integrins by modifying the conformation of their extracellular heads, thereby increasing their affinity for the ECM.[6,7] Activated integrins also cluster together to form more robust stuctures that are linked to

actin filaments by talin and paxillin.[5] The retrograde flow of actin filaments applies forces on the adhesion complex that seem to be essential to their formation and sustainability. As tensions increase, adhesion complexes grow and mature as strengthening proteins such as vinculin are added to the structure.[8] A rearward motion of these adhesion complexes can be observed as the cell body moves forward. Once they reach a certain point, they begin disassembly as to not impede with migration. Cells that cannot effectively disassemble adhesion complexes are considerably slowed in their advance since they cannot detach from the substratum.[9,10] Adhesion turnover also serves to recycle adhesion proteins to the cell front so that they may aid in the construction of new complexes.[11]

Disassembly seems to rely on "relaxation" signals carried by microtubules. Early observations showed that adhesions are destabilized as microtubules grow towards them. These filaments may in fact stimulate loss of tension by bringing focal adhesion kinase (FAK) and calpains to the adhesion site. Phosphorylation of paxillin by FAK contributes to the weakening of the structure, whereas calpains physically disrupt the link between actin and the ECM by cleaving talin.[12,13] Ubiquitination also seems to partake in adhesion disassembly, as several proteins, such as FAK, paxillin and integrins are ubiquitinated during this process.[14] The final step involves the endocytosis of integrins, mainly by a clathrin-dependent pathway.[15] Once internalized, integrins can either be transported to the cell front for the formation of a new adhesion complex, or directed to autophagosomes and lysosomes for degradation.[16,17]

1.2. Chemotactic G protein-coupled receptors

With over 800 genes in Human encoding these seven transmembrane proteins, G-protein coupled receptors (GPCR) constitute the largest surface receptor family.[18] Their role is to help the cell adapt to its environment by translating extracellular cues to intracellular responses. GPCRs are involved in a wide assortment of physiological processes and as such, their ligands vary from hormones to lipids and even photons. Many GPCRs can drive cell migration by enhancing motility and guiding the orientation of actin polymerization and adhesion complexes formation. Three main types of GPCRs have been found to induce chemotaxis. These include receptors for chemokines, some vasoactive peptides and bioactive lipids.[19]

Chemokines constitute a large family of chemotactic cytokines that can stimulate directed cell migration upon binding to their GPCR. They are characterized by the presence of four cysteine residues in their sequence and are named according to the position of the two first ones. Therefore, they are classified in four groups (CC, CXC, C and CX3C) which bind to GPCRs named accordingly.[20] Few chemokine GPCRs have received as much attention as the C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4), notably for its involvement in the progression of a wide range of cancers as well as in the internalization of the HIV.[21,22] As such, these studies have shown that CXCR4 increases the migratory capacities of several immune cells, but also endothelial cells, neurons and different types of cancer cells.[21,23,24]

A few vasoactive peptides, initially characterized for the effects on the cardiovascular system, have more recently been shown to increase cell migration. For example, by binding to their cognate GPCRs, angiotensin II and endothelins can drive the migration of smooth muscle cells and endothelial cells.[25,26] Urotensin II, the most potent vasoactive peptide identified so far, is able to induce directed cell migration of monocytes, endothelial cells as well as glioma cells.[27–30] Several bioactive lipids have also been found to induce chemotaxis. One of the most notable examples is lysophosphatidic acid. It has been shown to drastically accelerate tumour growth by inducing angiogenesis and tumour invasion, two processes that rely on increased migration.[31,32]

Chemotactic GPCRs initiate signalling cascades that regulate cell migration by activating heterotrimeric G proteins, composed of three subunits, α, β and γ. Activation of a GPCR switches out the GDP for a GTP in the Gα subunit, which causes the dissociation of Gα from Gβγ. Each can than go on to regulate different intracellular signaling pathways.[33] Based on their sequences, Gα proteins can be split into four main subtypes: α_s, $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$, and $\alpha_{12/13}$.[34] Though previous studies have shown that all of these subunits can, in one way or another, modulate cell migration, it appears that GPCR-induced chemotaxis is mainly relayed by the $G\alpha_i$ and $G\alpha_{12/13}$ subtypes.[19,29] These have been linked to the activation of GTPases belonging to the Rho family: RhoA, Rac1 and Cdc42. Together, they orchestrate the construction of the dendritic actin network upholding the lamellipodium, as well as the birth and maturation of adhesions.

138 **2. The autophagy machinery**

139 **2.1. General mechanisms of autophagosome biogenesis**

140 Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an evolutionarily conserved
141 lysosomal pathway involved in the degradation of long lived proteins and cytoplasmic
142 organelles. This process, which is essential for normal turnover of cellular compartments, is
143 up-regulated in response to nutrient starvation. The mechanistic target of rapamycin
144 (mTOR) kinase is a key regulator of cell metabolism that represses autophagic activity when
145 nutrient conditions are adequate. mTOR is itself inhibited upon nutrient starvation, which
146 results in autophagy induction.[35] One of the first events in autophagy is the formation of the
147 phagophore, a cup-shaped isolation membrane. The edges of these phagophore membranes
148 elongate and thereby engulf portions of cytoplasm. After the fusion of the membrane edges,
149 the structure becomes a completed autophagosome, which later fuses with lysosomes,
150 resulting in the degradation of its luminal content. Several highly conserved autophagy (ATG)
151 proteins, which control key steps in the autophagy process, have been identified.[36] Initiation
152 of the phagophore requires the Beclin1-containing class-III PI3K complex, generation of
153 phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), and recruitment of the PI3P-binding proteins called
154 WD repeat domain phosphoinositide interacting (WIPI) and double FYVE domain- containing
155 protein 1 (DFCP1). These are followed by the recruitment of the ATG5-ATG12-ATG16L1
156 ternary complex, along with phosphatidylethanolamine-conjugated microtubule-associated
157 protein 1 light chain 3 beta (LC3-II), which are essential for elongation of the phagophore
158 membrane. While the ATG5-ATG12-ATG16L1 complex decorates the phagophore and
159 dissociates after completion of autophagosome formation, part of LC3-II remains associated
160 with fully formed autophagosomes.[37] In addition to its bulk degradation property, autophagy
161 also partakes in the clearance of specific substrates. This selective autophagy mainly
162 depends on cargo receptors such as neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) and p62, which can
163 bind to ubiquitin-tagged substrates. The receptors can also bind to LC3 *via* a LC3-interacting
164 region (LIR) motif which targets them to autophagosomes.[38–41]

165 **2.2. Sources of membrane for the expansion of the phagophore**

166 Phagophores require lipids to mature into autophagosomes. After more than 50 years of
167 investigations, the origin of the autophagosomal membranes is still a critical question.

168 Originally, the endoplasmic reticulum (ER) was proposed to be the primary source of these
169 membranes. Early electron microscopy studies identified a close relationship between the ER
170 and autophagic structures, suggesting that autophagosomal membranes are mainly
171 delivered from the ER.[42,43] Consistent with this idea, Ktistakis et al. showed that, in response
172 to amino acid starvation, the PI3P-binding protein DFCP1, translocates to PI3P-enriched
173 subdomains of the ER. These subdomains then constitute a platform for accumulation of
174 autophagosomal proteins, expansion of autophagosomal membranes and emergence of fully
175 formed autophagosomes.[44] Subsequent three-dimensional tomography studies[43,45]
176 demonstrated that subdomains of the ER form a cradle-like curve encircling isolation
177 membranes. The associated ER and isolation membranes are interconnected by a narrow
178 membrane extension from the isolation membrane. Recent studies found evidence that
179 apart from the ER, numerous other membrane sources are involved in the formation of
180 autophagosomes, including mitochondria, recycling endosomes and endocytic vesicles
181 budding from the plasma membrane. Hailey et al. elegantly demonstrated that, in starved
182 cells, mitochondria directly participate in autophagosome biogenesis.[46] They found that the
183 early autophagosomal maker, ATG5, transiently localizes to puncta on mitochondria,
184 followed by the late autophagosomal marker LC3. This study further showed that cell
185 starvation drives the delivery of lipid components from the mitochondrial outer membrane
186 to newly formed autophagosomes.

187 Recent reports demonstrated that recycling endosomes, through the formation of tubular
188 structures accumulating autophagy proteins, also supply membrane for autophagosome
189 biogenesis. In a siRNA-mediated screen, Knaevelsrud et al. identified the PX domain-
190 containing protein, SNX18, as a positive regulator of autophagy.[47] The membrane binding
191 and tubulation activities of SNX18, as well as its direct interaction with LC3, allow the
192 formation of LC3-ATG16L1-positive tubules emanating for recycling endosomes that provide
193 membrane input to forming autophagosomes. This study is in line with other findings[48]
194 showing that vesicular transport from recycling endosomes, negatively regulated by the
195 Rab11 effector protein TBC1D14, contributes to starvation-induced autophagy. Together,
196 these data indicate that the recycling compartment is not solely responsible for recycling of
197 plasma membrane receptors but also serves as a sorting station for controlled delivery of
198 membrane for autophagosome biogenesis.

199 Work from Rubinsztein's lab identified endocytic vesicles, trafficking to recycling
200 endosomes, as an important source of membrane for autophagosome biogenesis. Endocytic
201 vesicles can form from regions of the plasma membrane through different mechanisms, *i.e.*
202 clathrin-dependent and clathrin-independent vesicle budding.[49,50] Accumulation of ATG16L1
203 at clathrin-coated endocytic structures, through an interaction between ATG16L1 and the
204 clathrin adaptor AP2, and vesiculation of ATG16L1-positive precursors have been found to
205 contribute to autophagosome formation. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis, using
206 siRNAs targeting the clathrin heavy-chain or the clathrin adaptor AP2, causes defective
207 autophagosome biogenesis, which is associated with impaired uptake of plasma membrane
208 into pre-autophagosomal vesicles.[50] These ATG16L1-positive vesicles then undergo SNARE-
209 mediated homotypic fusion, generating tubulovesicular structures that increase in size,
210 enabling the acquisition of LC3 protein.[51] Similarly to ATG16L1-positive vesicles, generation
211 of clathrin-coated ATG9-positive vesicles from the plasma membrane also participates in
212 autophagosome formation. Surprisingly, ATG16L1 and ATG9 proteins have been found to
213 localize to distinct clathrin-coated vesicles and to traffic through different routes inside the
214 cell. Although both ATG9 and ATG16L1 proteins end up in recycling endosomes, ATG9 is
215 trafficked via EEA1-positive early endosomes, whereas ATG16L1 has minimal residence in
216 early endosomes.[52,53] The SNARE protein named VAMP3, which co-traffics with ATG9, seems
217 to be critical for the coalescence of ATG16L1 and ATG9 vesicles in recycling endosomes.[53]
218 The impact of this coalescence on the formation of tubules emanating from recycling
219 endosomes, driven by SNX18, deserves further investigations.

220

221 **3. Regulation of the autophagy machinery by G protein-coupled receptors**

222 To this day, very few GPCRs have been shown to directly affect autophagic activity. These
223 mainly include nutrient sensing receptors that increase anabolic processes via stimulation of
224 the mTOR kinase, a well-known autophagy repressor.[54,55] The amino-acid responsive
225 T1R1/T1R3 receptor is present in most tissues and acts as a sensor for the fed state and
226 amino acid availability. It has been suggested that this GPCR may impact autophagic activity
227 through mTOR stimulation. Reducing T1R3 levels in HeLa cells is sufficient to impair mTOR
228 activity and activate autophagy.[56] Angiotensin receptors have also been found to modulate

229 autophagic activity in cardiomyocytes,[57] podocytes[58] and in vascular smooth muscle cells,[59]
230 mainly through the generation of reactive oxygen species.

231 We recently found that chemotactic GPCRs CXCR4 and the urotensin II receptor (UT) also
232 reduce autophagic activity by inhibiting autophagosome biogenesis[60]. Unlike the studies
233 cited above, these anti-autophagic effects do not seem to be relayed by mTOR modulation,
234 but rather by inhibiting ATG16L1 recruitment to pre-autophagic vesicles budding from the
235 plasma membrane. While Ravikumar et al.[49] demonstrated that ATG16L1 recruitment is
236 dependent on its interaction with the AP2-clathrin complex, the data we obtained indicate
237 that ATG5 is also implicated. We demonstrated that activation of CXCR4 or UT reduces the
238 pool of ATG5 protein located at the plasma membrane, thereby reducing the recruitment of
239 ATG16L1. Accordingly, overexpression of recombinant ATG5 totally abrogates the anti-
240 autophagic activities of CXCR4 and UT, and siRNA-mediated knockdown of *ATG5* mimics the
241 inhibitory effects of these GPCRs on the formation of pre-autophagic endosomes. What is
242 the exact role of ATG5 in mediating the formation of pre-autophagic endosomes? We can
243 speculate that ATG5's membrane binding activity[61] might allow initial docking of an ATG5-
244 ATG16L1 complex to the plasma membrane in order to maximize the probability of
245 interaction between ATG16L1 and AP2-clathrin. Alternatively, since ATG5 can co-
246 immunoprecipitate from cell lysates with ATG16L1 and clathrin, and since the N-terminus
247 region of ATG16L1 allows both AP2-clathrin co-immunoprecipitation[50] and direct ATG5
248 binding,[62–64] it is conceivable that ATG5 may act as a bridge between ATG16L1 and AP2-
249 clathrin.

250

251 **4. G protein-coupled receptor-induced activation of calpains: a critical event that relays**
252 **pro-migratory and anti-autophagic properties**

253 **4.1 Pro-migratory properties of calpains**

254 Calpains are a ubiquitously expressed family of cysteine proteases that mediate cleavage of
255 specific substrates. Although calpain proteolysis can lead to full degradation of some of its
256 substrates, others are cleaved in a limited fashion, resulting in protein fragments that have
257 altered distributions and/or functions. Calpains have thus been found to be involved in a
258 number of processes such as development, cell death and motility.[65] Modulating cell

259 migration is one of the better known roles of these proteases. Studies conducted in
260 neutrophils have shown that calpain inhibition increases random migration, but decreases
261 GPCR-induced directional migration upon exposure to a gradient of interleukin 8.[66] In
262 neurons, calpain activity was also shown to be essential for SDF1-induced actin
263 reorganization and directional migration.[67] These results are in line with work highlighting
264 the role of the calpain 2 isoform during lamellipodium formation. Calpain 2 controls cell
265 protrusion by cleaving cortactin, a key modulator of actin branching at the cell front.
266 Expression of a calpain-resistant form of cortactin reduces the migration of fibroblasts by
267 increasing the number of transient and inefficient cell protrusions.[68] Calpains also play an
268 important role in the dynamics of adhesion formation and disassembly. By modifying the
269 cytoplasmic tail of β-integrins, they seem to be essential for the formation of integrin
270 clusters at an early stage of adhesion complex assembly.[69] Talin is another calpain target
271 during these initial steps. Talin cleavage promotes its binding to β-integrin tails and serves as
272 a first link between integrins and actin filaments.[70] In addition to their role during this
273 assembly phase, calpains are also one of the main actors of adhesion disassembly. They
274 contribute to adhesion turnover by destabilizing the structural integrity of the complex.
275 Several proteins such as paxillin, vinculin and talin are in fact targeted by calpains during this
276 stage.[71–73] Inhibiting calpains with either calpastatin or pharmacological means significantly
277 slows adhesion turnover.[74] Similar results can be obtained following calpain 2 knockdown,
278 which results in large, long lasting adhesion complexes that inhibit cell detachment and
279 therefore impair cell migration.[13]

280 **4.2 Anti-autophagic properties of calpains**

281 A growing amount of data suggest that calpains are major inhibitors of the autophagy
282 machinery. SiRNA-mediated knockdown of calpain 1 is sufficient to induce autophagy under
283 nutrient rich conditions, correlated with increased levels of LC3-II and ATG5-ATG12
284 complex.[75] Using a cell-free system, Yousefi et al. demonstrated that ATG5 can be cleaved by
285 both calpain 1 and calpain 2.[76] Cleavage of ATG5 then generates a 24 kDa N-terminal
286 product that can translocate to the mitochondria and enhance susceptibility towards
287 apoptotic stimuli.[76] In vitro experiments also identified ATG3, ATG4, ATG7, ATG9, ATG10,
288 ATG12 and Beclin1 as direct calpain substrates.[77,78] It should be noted that calpains may also
289 exert their anti-autophagic properties by targeting *non-ATG* proteins. The clathrin adaptors

290 AP2 and PICALM, which are critical for the formation of pre-autophagosomal vesicles from
291 the plasma membrane, have been described as calpain substrates.[79–81] Does calpain-
292 dependent repression of autophagy then constitute a critical event for chemotaxis? In favor
293 of this hypothesis, we found that the anti-autophagic and pro-migratory properties of two
294 chemotactic GPCR, CXCR4 and UT, were abrogated by pharmacological inhibition or siRNA
295 knockdown of calpains.[60] We further demonstrated that calpain activation, induced by
296 CXCR4 or UT, reduces the pool of ATG5 at the plasma membrane and inhibits the
297 recruitment of ATG16L1 protein to endocytic vesicles, thereby limiting the formation of pre-
298 autophagosomal precursors required for the expansion of the phagophore and formation of
299 mature autophagosomes. In addition to reversing the anti-autophagic effects of chemotactic
300 GPCRs, calpain inhibition or ATG5 overexpression is also sufficient to block their pro-
301 migratory properties, as both these approaches reduce migration as well as the number of
302 adhesions per cell.[60] Despite early reports pointing to ATG5 as a calpain target, our attempts
303 at demonstrating its direct cleavage following CXCR4 or UT activation were unsuccessful.
304 One hypothesis is that only a minor, plasma membrane-associated fraction of ATG5 is
305 cleaved. The cleaved products may also be highly unstable, thereby hindering their
306 detection. Alternatively, the anti-autophagic action of calpains following GPCR activation
307 could depend on the cleavage of other proteins mentioned above, such as AP2 and PICALM,
308 or ATG7 which is essential for conjugation of ATG5 to ATG12.[82] Since the recruitment of
309 calpains at the plasma membrane constitutes an early event during chemotaxis,[83] it can be
310 anticipated that GPCR-induced inhibition of autophagy may tightly control early steps of cell
311 polarization.
312

313 **5. G protein-coupled receptor-induced inhibition of autophagy: potential impact on**
314 **chemotactic migration and invasion**

315 **5.1. Lamellipodium expansion versus autophagosome biogenesis: competition for a**
316 **common source of membrane?**

317 During GPCR-induced chemotactic migration, efficient expansion of the lamellipodium
318 requires addition of extra membrane at the leading edge, through polarized, microtubule-
319 dependent exocytosis.[84–86] Work from Veale et al. identified VAMP3-positive recycling
320 endosomes as an important source of internal membrane that is incorporated at the leading

321 edge during macrophage migration.[87] The authors further demonstrated that, in order for
322 this to happen, the R-SNARE VAMP3 needs to form a complex with its cognate Q-SNARE
323 complex Stx4/SNAP23 located on the cell surface. Loss of any one of the components of the
324 VAMP3/Stx4/SNAP23 complex inhibits efficient lamellipodium formation and alters cell
325 migration. Along with the incorporation of extra membrane, this mechanism also allows the
326 recycling of cell adhesion components at the leading edge, including integrins.[87]

327 Since recycling endosomes, through the SNX18-dependent formation of tubules, supply
328 membrane for phagophore expansion, it is conceivable that this compartment may
329 constitute a sorting station that deliver phospholipids in a competitive manner, for either
330 lamellipodium expansion or autophagosome synthesis. The dynamic increase in plasma
331 membrane surface triggered by chemotactic GPCR may then directly impact the pool of
332 phospholipids available for autophagic activity. How could activation of GPCRs, located at
333 the cell surface, affect the trafficking of membrane from recycling endosomes? Chemotactic
334 GPCRs CXCR4 and UT alter, through the activation of calpains, the recruitment of ATG16L1 in
335 pre-autophagosomal vesicles budding from the plasma membrane.[60] This may reduce the
336 pool of ATG16L1 targeted to the recycling compartment and limit the coalescence of
337 ATG16L1 and ATG9 vesicles. Inhibition of ATG16L1 and ATG9 coalescence would then favour
338 the delivery of VAMP3-positive vesicles at the cell front, at the expense of the phagophore
339 (**Figure**).

340 **5.2. Front cell's accumulation of focal adhesion components**

341 Among the hallmarks of cell migration, the formation of adhesion complexes at the cell's
342 leading edge is among the most notable. Adhesions are critical in generating the traction
343 required for the cell's forward movement. Several data have demonstrated autophagic
344 degradation of key proteins involved in initiation and maturation of adhesion complexes,
345 indicating that autophagy can regulate adhesion dynamics. The Src kinase, which is involved
346 in adhesion signalling, was shown to co-immunoprecipitate with LC3 and to be degraded by
347 autophagy.[88] In fibroblasts, β1 integrin-containing vesicles co-localize with LC3-stained
348 autophagic structures. Inhibition of autophagy by ATG5 or ATG3 knockdown is able to slow
349 β1 integrin degradation and to promote it's recycling to the plasma membrane.[17] Kenific et
350 al.[88] recently demonstrated that the selective autophagy cargo receptor NBR1 is essential for
351 adhesion turnover and for the autophagic capture of multiple adhesion proteins including

352 paxillin, vinculin and zyxin. Furthermore, paxillin was shown to have its own LIR domain,
353 which is also involved in its autophagic degradation.[90] In agreement with a role of autophagy
354 in adhesion disassembly, global inhibition of autophagosome biogenesis, using knockdown
355 strategies against ATG proteins, results in the accumulation of large and unproductive
356 adhesions at the entire cell periphery that reduce cell migration.[89–91] Caution should be
357 taken when interpreting migration studies that utilize these approaches since global
358 inhibition of autophagy may reflect the effects of exposure to a homogeneous concentration
359 of chemokine rather than a gradient[29]. We can speculate that the anti-autophagic effects of
360 chemotactic GPCRs, that we described,[60] may be important to locally control adhesion
361 turnover. At the front-most part of the cell, chemotactic GPCRs activated by a gradient of
362 ligand could inhibit autophagy to favour adhesion formation, while autophagy would remain
363 active at distance from the site of GPCR activation/signalling in order to enable focal
364 adhesion disassembly.

365 **5.3. Front cell's accumulation of proteins participating in actin remodelling**

366 Chemotactic GPCRs are known to induce actin polymerization at the cell's leading edge to
367 allow the lamellipodium to protrude towards the chemoattractant stimulus. Interestingly, a
368 number of proteins involved in actin dynamics and lamellipodium expansion have been
369 shown to be degraded by autophagy. A Proteomic analysis allowed the identification of the
370 actin regulators twinfilin, WIPF1, cortactin and cofilin 1 in ATG16L1-positive pre-autophagic
371 vesicles budding from the plasma membrane.[92] Recent studies also indicate that the Rho
372 GTPases Rac1 and RhoA can be regulated by autophagy. Using keratinocytes, Carroll et al.
373 showed that Rac1 is inactivated during starvation induced autophagy.[92] LC3 is able to block
374 Rac1 activation by binding to one of its effectors, Armus. LC3 can also directly interact with
375 Rac1, though whether this leads to Rac1 degradation remains to be determined. Active RhoA
376 and its regulator GEF-H1, can be ubiquitinated and recognized by p62, therefore leading to
377 their selective degradation by the autophagic machinery.[94,95] Autophagy inhibition by shRNA
378 targeting of ATG5 leads to an accumulation of RhoA at the cell surface and to the formation
379 of actin rich lamellipodia. Interestingly, Belaid et al. found that the intense actin
380 polymerization caused by RhoA accumulation actually impairs cell motility. Once again, this
381 implies that autophagy inhibition by chemotactic GPCRs may be fine-tuned and
382 compartmentalized at the cell front in order to support effective cell migration.

383 **5.4. Induction of the EMT**

384 Epithelial to mesenchymal transition (EMT) plays a fundamental role in embryonic
385 development and tissue repair. Numerous lines of evidence indicate that EMT also
386 participates in tumor progression and metastasis. Once undergoing EMT, tumoral cells lose
387 their apical-basal polarity, and acquire a mesenchymal phenotype characterized by an
388 elongated morphology and increased motility.[96] This allows them to detach from the primary
389 site and invade the surrounding tissues and blood vessels. Interestingly, recent publications
390 also link EMT to glioblastoma progression. Although not of epithelial origin, glioblastoma
391 cells can engage an EMT-like process that increases their invasive properties.[97] EMT has
392 been shown to be driven by a variety of signals, such as transforming growth factor-β, insulin
393 growth factor II, or epidermal growth factor.[98] These EMT inducers then lead to the
394 activation of core transcription factors, including Snail and Slug, ZEB1/2, and Twist.[99]

395 A first link between autophagy and EMT was established by Lv et al., demonstrating that, in
396 breast cancer cells, the intracellular signalling protein DEDD (death-effector domain-
397 containing DNA-binding protein) inhibits EMT through the activation of autophagy and
398 consecutive degradation of Snail and Twist.[100] Snail and Twist were found to colocalize with
399 the autophagosomal marker LC3, and inhibition of autophagy using 3-methyladenine
400 significantly reduced their degradation rates.[100] Using mouse embryonic fibroblast (MEF)
401 cells, Qiang et al. found that ATG3, ATG5, ATG9 or ATG12 knockout cells exhibit much higher
402 invasive properties than wild-type cells.[101] The authors demonstrated that autophagy
403 deficiency promotes EMT events through the accumulation of p62 in the cytosol.
404 Accumulating p62 then binds to Twist1 and prevents its proteasomal degradation. A recent
405 study obtained in glioblastoma indicates that autophagy inhibition, through the knockdown
406 of ATG5 or ATG7, stimulates the expression of the EMT regulators Snail and Slug, as well as
407 cell invasion. [102]

408 From these data, it can be expected that inhibition of autophagy by chemotactic GPCR, such
409 as CXCR4 or UT,[60] may constitute a critical event participating in EMT during tumor
410 progression. This hypothesis is reinforced by recent reports demonstrating that, in addition
411 to classical EMT inducers, CXCR4's ligand, CXCL12, drives Twist-dependent EMT-like events in
412 human glioblastoma cells,[103] as well as EMT in numerous peripheral cancers[104–106] and UT's

413 ligand, urotensin II, promotes the expression of EMT markers in renal tubular epithelial
414 cells.[107]

415

416 **Concluding remarks**

417 Although there are still many gaps in our understanding of how Atg proteins control
418 chemotactic migration and cancer cell invasion, it is now clear that the autophagy machinery
419 has major impacts on these processes. Specifically, degradation of focal adhesion
420 components, through selective autophagy, has already been shown to participate in the
421 turnover of adhesions during cancer cell migration. Autophagic degradation of key proteins
422 participating in actin remodelling may also constitute an efficient way of clearing these
423 proteins from the cell rear and concentrating them at the cell front, in order to initiate the
424 expansion of a single lamellipodium in the direction of the chemotactic stimulus. The recent
425 identification of the plasma membrane as a donor compartment for the expansion of the
426 phagophore constituted an essential step in the comprehension of how chemotactic
427 receptors could locally control autophagic flux. Deciphering the signalling cascades triggered
428 by these receptors, and their impacts on the trafficking and/or processing of the core Atg
429 proteins is an exciting challenge for the future and will help to envisage innovative strategies
430 to halt cancer metastasis.

431 **References**

432 1. Keller R. Cell migration during gastrulation. Curr Opin Cell Biol 2005; 17:533–41.

433 2. Imhof B, Dunon D. Basic mechanism of leukocyte migration. Horm Metab Res 1997;
434 29:614–21.

435 3. Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during
436 metastasis. Curr Opin Cell Biol 2012; 24:277–83.

437 4. Weiner OD. Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: The chemotactic
438 compass. Curr Opin Cell Biol 2002; 14:196–202.

439 5. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy GG, Parsons JT,
440 Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. Science 2003;
441 302:1704–10.

442 6. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. Cold
443 Spring Harb Perspect Biol 2011; 3:1–15.

444 7. Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH,

445 Calderwood DA. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin
446 activation. Science 2003; 302:103–6.

447 8. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR.
448 Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent
449 adhesions in a myosin II motor-independent manner. Nat Cell Biol 2008; 10:1039–50.

450 9. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. Microtubule-induced focal adhesion
451 disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. Nat Cell Biol 2005;
452 7:581–90.

453 10. Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Microtubule targeting of substrate contacts
454 promotes their relaxation. J Cell Biol 1999; 146:1033–43.

455 11. Margadant C, Monsuur HN, Norman JC, Sonnenberg A. Mechanisms of integrin
456 activation and trafficking. Curr Opin Cell Biol 2011; 23:607–14.

457 12. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF.
458 FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly.
459 Nat Cell Biol 2004; 6:154–61.

460 13. Franco SJ, Rodgers M a, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, Huttenlocher A.
461 Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. Nat Cell Biol 2004;
462 6:977–83.

463 14. Huang C. Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. Cell Adh Migr
464 2014; 4:10–8.

465 15. Ezratty EJ, Bertaux C, Marcantonio EE, Gundersen GG. Clathrin mediates integrin
466 endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. J Cell Biol 2009;
467 187:733–47.

468 16. Maritzen T, Schachtner H, Legler DF. On the move: endocytic trafficking in cell
469 migration. Cell Mol Life Sci 2015; 72:2119–34.

470 17. Tuloup-Minguez V, Hamaï A, Greffard A, Nicolas V, Codogno P, Botti J. Autophagy
471 modulates cell migration and β1 integrin membrane recycling. Cell Cycle 2013;
472 12:3317–28.

473 18. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled
474 receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis,
475 paralogon groups, and fingerprints. Mol Pharmacol 2003; 63:1256–72.

476 19. Cotton M, Claing A. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell
477 migration. Cell Signal 2009; 21:1045–53.

478 20. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH,
479 Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature
480 for chemokine receptors. Pharmacol Rev 2000; 52:145–76.

481 21. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer.
482 Adv Cancer Res 2014; 124:31–82.

483 22. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA

484 cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science 1996;
485 272:872–7.

486 23. Salcedo R, Zhang X, Young HA, Michael N, Wasserman K, Ma W-H, Martins-Green M,
487 Murphy WJ, Oppenheim JJ. Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by
488 up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. Blood 2003;
489 102:1966–77.

490 24. Tiveron MC, Cremer H. CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. Curr Opin
491 Neurobiol 2008; 18:237–44.

492 25. Daher Z, Noël J, Claing A. Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells
493 through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. Cell Signal 2008;
494 20:2256–65.

495 26. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway
496 in Ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells.
497 Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:73–82.

498 27. Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S. Urotensin II induces migration of endothelial
499 progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. Tohoku J Exp Med
500 2009; 219:283–8.

501 28. Segain J-P, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Loirand G,
502 Pacaud P. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing
503 monocytes. J Immunol 2007; 179:901–9.

504 29. Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet P-O, Le Joncour V, Brulé C,
505 Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, Laquerrière A, Proust F, Gandolfo P, Morin F, Castel
506 H. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic
507 chemotaxic mechanism in glioma. Oncogene 2015; 34:5080–94.

508 30. Brulé C, Perzo N, Joubert JE, Sainsily X, Leduc R, Castel H, Prézeau L. Biased signaling
509 regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular
510 behaviors. FASEB J 2014; 28:5148–62.

511 31. Blackburn J, Mansell JP. The emerging role of lysophosphatidic acid (LPA) in skeletal
512 biology. Bone 2012; 50:756–62.

513 32. Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. Mol Pharmacol 2000;
514 58:1188–96.

515 33. Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de
516 Jong P, Reed RR, Simon MI. Evolution of the mammalian G protein alpha subunit
517 multigene family. Nat Genet 1992; 1:85–91.

518 34. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins. Science 1991; 252:802–
519 8.

520 35. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K. AMPK and mTOR regulate autophagy through
521 direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol 2011; 13:132–41.

522 36. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy
523 mechanisms: lessons from yeast. Mol Cell Biol 2009; 10:458–67.

524 37. Abada A, Elazar Z. Getting ready for building: signaling and autophagosome
525 biogenesis. EMBO Rep 2014; 15:839–52.

526 38. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H,
527 Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a
528 protective effect on huntingtin-induced cell death. J Cell Biol 2005; 171:603–14.

529 39. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of selective autophagy. J Mol Biol 2016;
530 428:1714–24.

531 40. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G,
532 Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of
533 ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem 2007; 282:24131–45.

534 41. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG,
535 Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Øvervatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M,
536 Dikic I, Johansen T. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated
537 substrates. Mol Cell 2009; 33:505–16.

538 42. Novikoff AB, Shin W-Y. Endoplasmic reticulum and autophagy in rat hepatocytes. Proc
539 Natl Acad Sci USA 1978; 75:5039–42.

540 43. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A
541 subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome
542 formation. Nat Cell Biol 2009; 11:1433–7.

543 44. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G,
544 Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in
545 phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic
546 reticulum. J Cell Biol 2008; 182:685–701.

547 45. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections
548 between the phagophore and endoplasmic reticulum. Autophagy 2009; 5:1180–5.

549 46. Hailey DW, Kim PK, Satpute-Krishnan P, Rambold AS, Sougrat R, Lippincott-Schwartz J.
550 Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation.
551 Cell 2010; 141:656–67.

552 47. Knævelsrud H, Søreng K, Raiborg C, Håberg K, Rasmuson F, Brech A, Liestøl K, Rusten
553 TE, Stenmark H, Neufeld TP, Carlsson SR, Simonsen A. Membrane remodeling by the
554 PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. J Cell Biol 2013;
555 202:331–49.

556 48. Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura SI, Barr FA, Tooze SA. TBC1D14 regulates
557 autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. J Cell
558 Biol 2012; 197:659–75.

559 49. Moreau K, Ravikumar B, Puri C, Rubinsztein DC. Arf6 promotes autophagosome
560 formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. J
561 Cell Biol 2012; 196:483–96.

562 50. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane
563 contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. Nat Cell Biol 2010;

564 12:747–57.

565 51. Moreau K, Ravikumar B, Renna M, Puri C, Rubinsztein DC. Autophagosome precursor
566 maturation requires homotypic fusion. Cell 2011; 146:303–17.

567 52. Zavodszky E, Vicinanza M, Rubinsztein DC. Biology and trafficking of ATG9 and
568 ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. FEBS Lett 2013;
569 587:1988–96.

570 53. Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse autophagosome
571 membrane sources coalesce in recycling endosomes. Cell 2013; 154:1285–99.

572 54. Wauson EM, Dbouk HA, Ghosh AB, Cobb MH. G protein-coupled receptors and the
573 regulation of autophagy. Trends Endocrinol Metab 2014; 25:274–82.

574 55. Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H. mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett
575 2010; 584:1287–95.

576 56. Wauson EM, Zaganjor E, Lee AY, Guerra ML, Ghosh AB, Bookout AL, Chambers CP,
577 Jivan A, McGlynn K, Hutchison MR, Deberardinis RJ, Cobb MH. The G protein-coupled
578 taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy. Mol Cell 2012; 47:851–
579 62.

580 57. Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, Allen AM, Harrap SB, Thomas WG, Delbridge LMD.
581 Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated
582 cardiomyocyte autophagy. Hypertension 2009; 53:1032–40.

583 58. Yadav A, Vallabu S, Arora S, Tandon P, Slahan D, Teichberg S, Singhal PC. ANG II
584 promotes autophagy in podocytes. Am J Cell Physiol 2010; 299:C488–96.

585 59. Yu K-Y, Wang Y-P, Wang L-H, Jian Y, Zhao X-D, Chen J-W, Murao K, Zhu W, Dong L,
586 Wang G-Q, Zhang G-X. Mitochondrial KATP channel involvement in angiotensin II-
587 induced autophagy in vascular smooth muscle cells. Basic Res Cardiol 2014; 109:416–
588 31.

589 60. Coly P-M, Perzo N, Le Joncour V, Lecointre C, Schouft M-T, Desrues L, Tonon M-C,
590 Wurtz O, Gandolfo P, Castel H, Morin F. Chemotactic G protein-coupled receptors
591 control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. Autophagy 2016;
592 12:1–19.

593 61. Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schüchner S, Ogris E, Kraft C, Martens S. Mechanism
594 and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during
595 autophagosome formation. EMBO J 2012; 31:4304–17.

596 62. Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, Otomo T. Structure of the human ATG12~ATG5
597 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. Nat Struct Mol Biol 2013; 20:59–
598 66.

599 63. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-
600 Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. EMBO J 1999; 18:3888–96.

601 64. Kim JH, Hong SB, Lee JK, Han S, Roh K-H, Lee K-E, Kim YK, Choi E-J, Song HK. Insights
602 into autophagosome maturation revealed by the structures of ATG5 with its
603 interacting partners. Autophagy 2015; 11:75–87.

604 65. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. Physiol Rev 2003;
605 83:731–801.

606 66. Lokuta MA, Nuzzi PA, Huttenlocher A. Calpain regulates neutrophil chemotaxis. Proc
607 Natl Acad Sci USA 2003; 100:4006–11.

608 67. Lysko DE, Putt M, Golden JA. SDF1 reduces interneuron leading process branching
609 through dual regulation of actin and microtubules. J Neurosci 2014; 34:4941–62.

610 68. Perrin BJ, Amann KJ, Anna H. Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane
611 protrusion during cell migration. Mol Biol Cell 2006; 17:239–50.

612 69. Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, Goll DE, Saido TC, Fox JEB. Evidence that beta3
613 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin
614 clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as
615 Rac and RhoA become active. J Cell Biol 2000; 151:685–95.

616 70. Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. Calpain cleavage promotes talin
617 binding to the beta3 integrin cytoplasmic domain. J Biol Chem 2001; 276:28164–70.

618 71. Serrano K, Devine DV. Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation:
619 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. Cell Motil
620 Cytoskeleton 2004; 58:242–52.

621 72. Franco S, Perrin B, Huttenlocher A. Isoform specific function of calpain 2 in regulating
622 membrane protrusion. Exp Cell Res 2004; 299:179–87.

623 73. Carragher NO, Levkau B, Ross R, Raines EW. Degraded collagen fragments promote
624 rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of
625 pp125(FAK), paxillin, and talin. J Cell Biol 1999; 147:619–29.

626 74. Bhatt A, Kaverina I, Otey C, Huttenlocher A. Regulation of focal complex composition
627 and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. J Cell Sci 2002;
628 115:3415–25.

629 75. Xia H-G, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D, Yuan J. Control of basal
630 autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. Autophagy 2010; 6:61–6.

631 76. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon
632 H-U. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat Cell Biol
633 2006; 8:1124–32.

634 77. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective Hepatic Autophagy in Obesity
635 Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. Cell Metab 2010; 11:467–78.

636 78. Norman JM, Cohen GM, Bampton ETW. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by
637 cell death proteases. Autophagy 2010; 6:1042–56.

638 79. Ando K, Brion JP, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, Chanut A, Lacor P,
639 Lavaur J, Sazdovitch V, Rogaeva E, Potier MC, Duyckaerts C. Clathrin adaptor
640 CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's
641 brains. Acta Neuropathol 2013; 125:861–78.

642 80. Rudinskiy N, Grishchuk Y, Vaslin A, Puyal J, Delacourte A, Hirling H, Clarke PGH, Luthi-

643 Carter R. Calpain hydrolysis of α- and β2-adaptins decreases clathrin-dependent
644 endocytosis and may promote neurodegeneration. J Biol Chem 2009; 284:12447–58.

645 81. Kim JA, Kim HL. Cleavage of purified neuronal clathrin assembly protein (CALM) by
646 caspase 3 and calpain. Exp Mol Med 2001; 33:245–50.

647 82. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. A new protein conjugation system in
648 human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for
649 autophagy. J Biol Chem 1998; 273:33889–92.

650 83. Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. J Cell Sci
651 2005; 118:3829–38.

652 84. Schmoranzer J, Kreitzer G, Simon S. Migrating fibroblasts perform polarized,
653 microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. J Cell Sci 2003;
654 116:4513–9.

655 85. Pierini LM, Lawson MA, Eddy RJ, Hendey B, Maxfield FR. Oriented endocytic recycling
656 of α5β1 in motile neutrophils. Blood 2000; 95:2471–80.

657 86. Bretscher MS, Aguado-Velasco C. Membrane traffic during cell locomotion. Curr Opin
658 Cell Biol 1998; 10:537–41.

659 87. Veale KJ, Offenhäuser C, Whittaker SP, Estrella RP, Murray RZ. Recycling endosome
660 membrane incorporation into the leading edge regulates lamellipodia formation and
661 macrophage migration. Traffic 2010; 11:1370–9.

662 88. Sandilands E, Serrels B, McEwan DG, Morton JP, Macagno JP, McLeod K, Stevens C,
663 Brunton VG, Langdon WY, Vidal M, Sansom OJ, Dikic I, Wilkinson S, Frame MC.
664 Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK
665 signalling. Nat Cell Biol 2012; 14:51–60.

666 89. Kenific CM, Stehbens SJ, Goldsmith J, Leidal AM, Faure N, Ye J, Wittmann T, Debnath J.
667 NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. J Cell Biol 2016;
668 212:577–90.

669 90. Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, Zamora M, Mui S, Macleod KF.
670 Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor
671 cells through the direct interaction of paxillin with LC3. Cell Rep 2016; 15:1660–72.

672 91. Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. Autophagy in adhesion and migration. J Cell Sci
673 2016; 129:3685–93.

674 92. Morozova K, Sidhar S, Zolla V, Clement CC, Scharf B, Verzani Z, Diaz A, Larocca JN,
675 Hajjar KA, Cuervo AM, Santambrogio L. Annexin A2 promotes phagophore assembly
676 by enhancing Atg16L+ vesicle biogenesis and homotypic fusion. Nat Commun 2015;
677 6:5856–68.

678 93. Carroll B, Mohd-Naim N, Maximiano F, Frasa MA, McCormack J, Finelli M, Thoresen
679 SB, Perdios L, Daigaku R, Francis RE, Futter C, Dikic I, Braga VMM. The TBC/RabGAP
680 Armus coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy. Dev Cell 2013; 25:15–
681 28.

682 94. Belaid A, Ndiaye PD, Cerezo M, Cailleteau L, Brest P, Klionsky DJ, Carle GF, Hofman P,

683 Mograbi B. Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again: emerging roles of
684 autophagy in the degradation of signaling proteins. Autophagy 2014; 10:201–8.

685 95. Yoshida T, Tsujioka M, Honda S, Tanaka M. Autophagy suppresses cell migration by
686 degrading GEF-H1 , a RhoA GEF. Oncotarget 2016; 7:1–10.

687 96. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest
688 2009; 119:1420–8.

689 97. Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a
690 relevant molecular event in malignant gliomas. Cancer Lett 2013; 331:131–8.

691 98. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in
692 Development and Disease. Cell 2009; 139:871–90.

693 99. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer.
694 Nat Med 2013; 19:1438–49.

695 100. Lv Q, Wang W, Xue J, Hua F, Mu R, Lin H, Yan J, Lv X, Chen X, Hu ZW. DEDD interacts
696 with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in
697 human breast cancer. Cancer Res 2012; 72:3238–50.

698 101. Qiang L, Zhao B, Ming M, Wang N, He T-C, Hwang S, Thorburn A, He Y-Y. Regulation of
699 cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. Proc Natl Acad
700 Sci USA 2014; 111:9241–6.

701 102. Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, Faienza F,
702 Esposito V, Limatola C, Cecconi F, Di Bartolomeo S. Autophagy induction impairs
703 migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. Mol Oncol 2015;
704 9:1612–25.

705 103. Yao C, Li P, Song H, Song F, Qu Y, Ma X, Shi R, Wu J. CXCL12/CXCR4 axis upregulates
706 Twist to induce EMT in human glioblastoma. Mol Neurobiol 2016; 53:3948–53.

707 104. Li X, Li P, Chang Y, Xu Q, Wu Z, Ma Q, Wang Z. The SDF-1/CXCR4 axis induces
708 epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Mol Cell Biochem
709 2014; 392:77–84.

710 105. Hu TH, Yao Y, Yu S, Han LL, Wang WJ, Guo H, Tian T, Ruan ZP, Kang XM, Wang J, Wang
711 SH, Nan KJ. SDF-1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and
712 progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway.
713 Cancer Lett 2014; 354:417–26.

714 106. Roccaro AM, Mishima Y, Sacco A, Moschetta M, Tai YT, Shi J, Zhang Y, Reagan MR,
715 Huynh D, Kawano Y, Sahin I, Chiarini M, Manier S, Cea M, Aljawai Y, Glavey S, Morgan
716 E, Pan C, Michor F, Cardarelli P, Kuhne M, Ghobrial IM. CXCR4 regulates extra-
717 medullary myeloma through epithelial-mesenchymal-transition-like transcriptional
718 activation. Cell Rep 2015; 12:622–35.

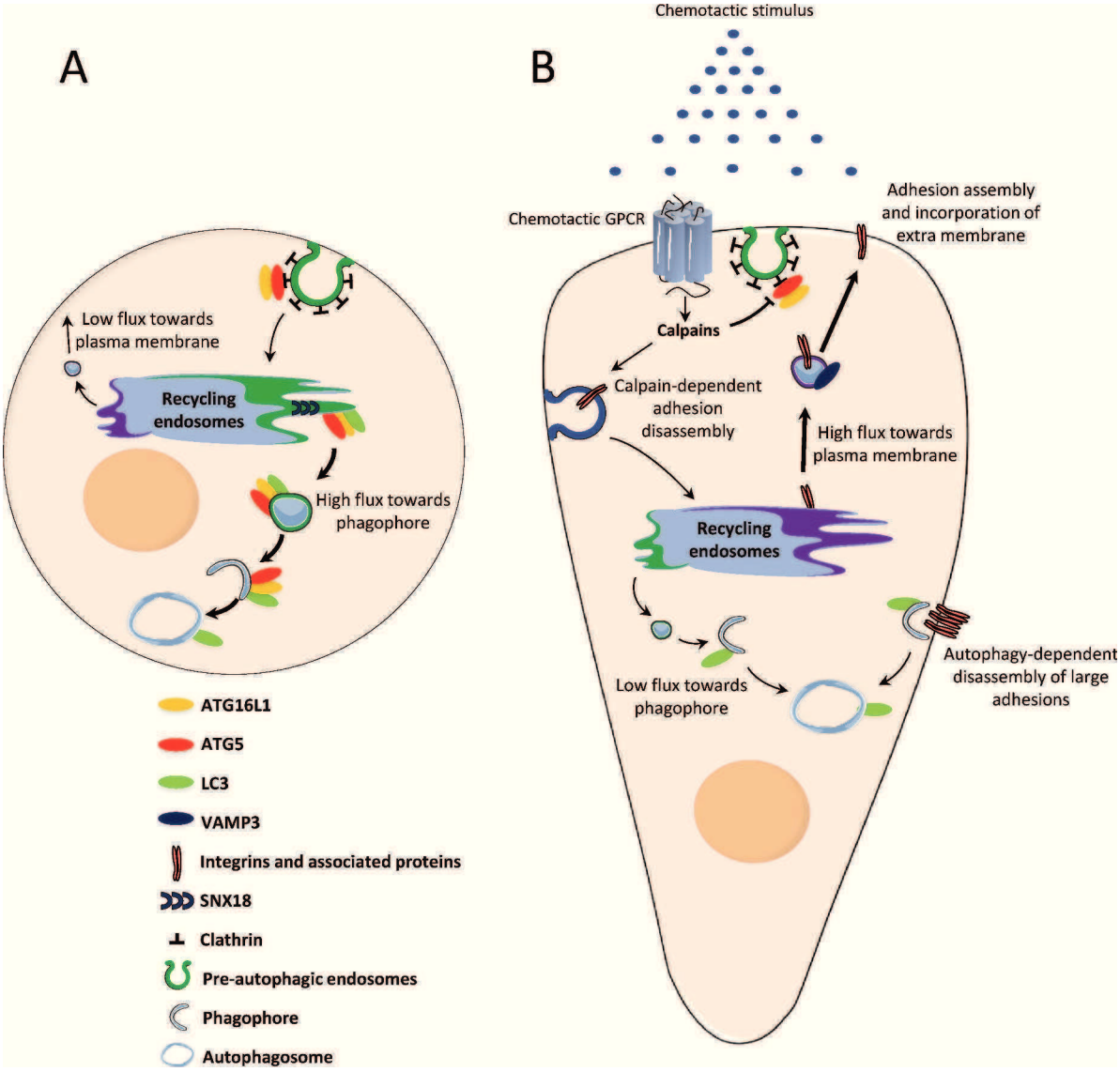
719 107. Pang XX, Bai Q, Wu F, Chen GJ, Zhang AH, Tang CS. Urotensin II induces ER stress and
720 EMT and increase extracellular matrix production in renal tubular epithelial cell in
721 early diabetic mice. Kidney Blood Press Res 2016; 41:434–49.

722

723 **Figure Legend**

724 **Figure: Chemotactic GPCR-mediated autophagy inhibition: potential role in chemotactic**
725 **migration. (A)** Under basal conditions, ATG5-ATG16L1-positive pre-autophagic endosomes
726 bud from the plasma membrane and are directed to the recycling endosome compartment.
727 From there, SNX18-dependent tubules target vesicles containing ATG5-ATG16L1 and LC3 to
728 the expanding phagophore. **(B)** Upon activation by chemoattractant stimuli, chemotactic
729 GPCRs locally inhibit the formation of pre-autophagic endosomes. The subsequent reduction
730 of ATG proteins in the recycling compartment may trigger a "targeting switch" which
731 reduces membrane flux towards the phagophore to favour VAMP3-enabled recycling to the
732 plasma membrane. Exocytosis allows integrins to be recycled to nascent adhesions, while
733 phospholipids are incorporated into the lamellipodium and contribute to its expansion.
734 Autophagy inhibition at the leading edge may also locally protect proteins involved in actin
735 remodelling and adhesion assembly, which would otherwise be sequestered and degraded.
736 Autophagy could remain active at distance from chemotactic GPCRs in order to participate in
737 the disassembly of large focal adhesions.

738


A
Low flux towards plasma membrane
Recycling endosomes
High flux towards phagophore
ATG16L1
ATG5
LC3
VAMP3
Integrins and associated proteins
SNX18
Clathrin
Pre-autophagic endosomes
Phagophore
Autophagosome
B
Chemotactic stimulus
Chemotactic GPCR
Adhesion assembly and incorporation of extra membrane
Calpains
Calpain-dependent adhesion disassembly
High flux towards plasma membrane
Recycling endosomes
Low flux towards phagophore
Autophagy-dependent disassembly of large adhesions

Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude révèlent un nouveau lien entre la machinerie autophagique et la signalisation des RCPG chimiotactiques. Par des expériences menées sur des cellules HEK-293, nous avons démontré que l'activation de deux RCPG chimiotactiques, le CXCR4 et l'UT, inhibe la biogenèse des autophagosomes en bloquant le recrutement de la protéine Atg16L1 sur des vésicules d'endocytose. Nous avons également démontré que ces effets anti-autophagiques sont essentiels à la formation des complexes d'adhésion, ainsi qu'à la migration cellulaire en direction d'un stimulus chimiotactique. Par ailleurs, nos études réalisées dans la lignée de glioblastome humain U87, exprimant le CXCR4 et l'UT de manière endogène, indiquent que cette modulation de l'autophagie par les RCPG chimiotactiques est également effective dans ces cellules cancéreuses, et impacte profondément leurs propriétés migratoires.

1. Modulation de l'activité autophagique par des RCPG chimiotactiques

1.1. Inhibition de la formation d'endosomes pré-autophagiques

A ce jour, peu de RCPG pouvant directement moduler l'activité autophagique ont été identifiés (Wauson *et al*., 2014a). C'est le cas par exemple de l'hétérodimère de RCPG T1R1-T1R3, sensible aux variations des taux extracellulaires d'acides aminés. L'activation de T1R1-T1R3 stimule la kinase mTOR, et conduit ainsi à l'inhibition de l'activité autophagique (Wauson *et al*., 2012). Les récepteurs à l'angiotensine II, AT1 et AT2, peuvent également moduler l'activité autophagique des cardiomyocytes (Porrello *et al*., 2009), des podocytes (Yadav *et al*., 2010) et des cellules musculaires lisses (Yu *et al*., 2014), essentiellement *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les résultats obtenus au cours de cette étude indiquent que les effets anti-autophagiques du CXCR4 et de l'UT ne sont pas relayés par une modulation de l'activité de la kinase mTOR, ou du complexe PI3K-III, mais dépendent de l'inhibition du recrutement de la protéine Atg16L1 sur des endosomes pré-autophagiques émanant de la membrane plasmique. L'équipe du Dr Rubinsztein a démontré que la formation de ces précurseurs autophagiques, Atg16L1-positifs, contribue de façon importante à la biogenèse des autophagosomes matures (Morozova *et al*., 2015 ; Puri *et al*., 2013 ; Ravikumar *et al*., 2010). Ces endosomes Atg16L1-positifs fusionnent entre eux, ainsi qu'avec des endosomes Atg9-positifs, et constituent une e de membrane essentielle à l'expansion du phagophore (Moreau *et al*., 2011 ; Morozova *et al*., 2015 ; Puri *et al*., 2013). En accord avec

les travaux de Ravikumar *et al.* (2010), nous avons souligné l'importance de ce phénomène dans notre modèle expérimental par l'utilisation d'un inhibiteur de l'endocytose, le *Dynasore*, qui provoque une diminution marquée de la biogenèse des autophagosomes.

Bien que les mécanismes de formation de ces vésicules ne soient pas entièrement élucidés, les travaux de Ravikumar *et al.* (2010) ont démontré que le complexe AP2-clathrine est essentiel au recrutement de la protéine Atg16L1 sur des vésicules à clathrine en cours de formation. Nos résultats indiquent que l'Atg5 participe également au recrutement de l'Atg16L1 sur ces vésicules. L'activation du CXCR4 ou de l'UT réduit fortement le pool d'Atg5 localisé à la membrane plasmique, et inhibe ainsi le recrutement de l'Atg16L1. Nous avons vérifié l'importance de la protéine Atg5 dans ce processus par l'utilisation d'ARN interférents. La réduction marquée des taux de transcrit et de protéine Atg5, sous l'effet des ARN interférents, s'accompagne d'une inhibition significative du recrutement de l'Atg16L1 sur les vésicules d'endocytose en cours de formation. De plus, nous avons démontré que la surexpression de l'Atg5 bloque totalement les effets anti-autophagiques du CXCR4 et de l'UT. Quel pourrait alors être le rôle précis de l'Atg5 dans la formation des endosomes pré-autophagiques ? Il est concevable que la capacité de l'Atg5 à lier les membranes (Romanov *et al.*, 2012) permet un ancrage initial du complexe Atg5-Atg16L1 à la membrane plasmique, afin d'augmenter la probabilité de rencontre de la protéine Atg16L1 et du complexe AP2-clathrine (Fig. 28A). Le CXCR4 et l'UT exerceraient alors leurs effets en empêchant l'ancrage du complexe Atg5-Atg16L1 à la membrane plasmique. Par ailleurs, puisque *i)* l'Atg5 co-immunoprécipite, à partir de lysats cellulaires, avec l'Atg16L1 et la clathrine (Ravikumar *et al.*, 2010), et *ii)* l'extrémité N-terminale de l'Atg16L1 permet à la fois la co-immunoprécipitation du complexe AP2-clathrine (Ravikumar *et al.*, 2010) et la liaison à l'Atg5 (Mizushima *et al.*, 2003 ; Otomo *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2015), il est également envisageable que l'Atg5 serve de « pont », reliant l'Atg16L1 au complexe AP2-clathrine. En ciblant l'Atg5, les RCPG empêcheraient alors le recrutement et l'internalisation de l'Atg16L1 vers des vésicules d'endocytose AP2-positives (Fig. 28B). A l'appui de cette dernière hypothèse, des résultats préliminaires indiquent que, contrairement à l'Atg5, le pool d'Atg16L1 localisé à la membrane plasmique augmente suite à l'activation de l'UT, suggérant une inhibition de l'internalisation de l'Atg16L1 dans ces conditions (Fig. 29). Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une analyse *in silico* de la séquence protéique de l'Atg5 humaine révèle deux sites potentiels d'interaction avec l'AP2 (Fig. 30). Des travaux supplémentaires, et notamment la production de mutants de l'Atg5 pour ces sites potentiels d'interaction, seront

nécessaires afin de préciser le rôle de cette protéine dans la formation des endosomes pré-autophagiques.

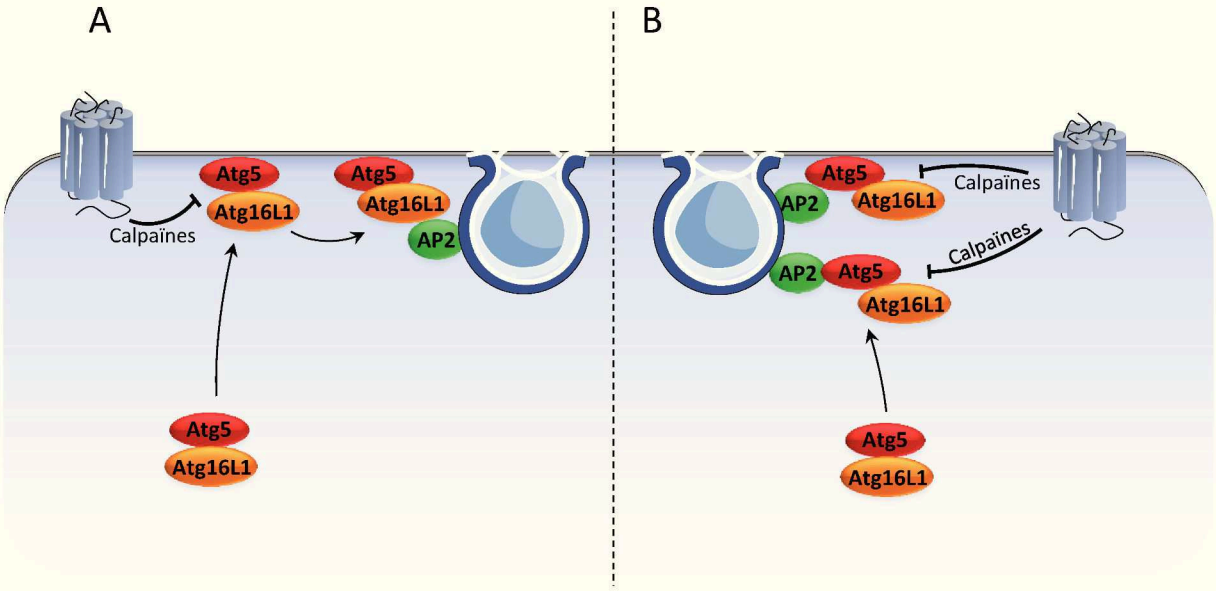


Figure 28 : Le recrutement de l'Atg16L1 sur des endosomes pré-autophagiques dépend de l'Atg5. Sur la base de nos résultats, et des données de la littérature, nous proposons deux modèles mécanistiques permettant la production d'endosomes pré-autophagiques, Atg5-Atg16L1-positifs. **(A)** La capacité de l'Atg5 à lier les membranes pourrait favoriser le recrutement du complexe Atg5-Atg16L1 à la membrane plasmique. Une interaction de l'AP2 avec l'Atg16L1 permettrait alors l'internalisation de ce complexe dans des vésicules à clathrine. **(B)** Une interaction directe de l'Atg5 avec l'AP2 pourrait permettre le recrutement du complexe Atg5-Atg16L1 (membranaire ou cytosolique) vers les vésicules à clathrine en cours de formation. Dans les deux cas, en ciblant l'Atg5, les RCPG chimiotactiques pourraient alors inhiber la formation des endosomes pré-autophagiques.

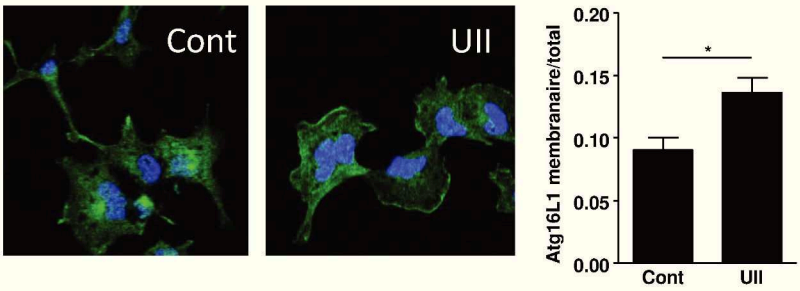


Figure 29 : L'activation de l'UT provoque une accumulation de la protéine Atg16L1 à la membrane plasmique. Des cellules HEK-293 exprimant l'UT ont été incubées (1 h) en absence ou en présence d'UII (10^{-9} M). Au terme du traitement, les cellules ont été fixées et la protéine Atg16L1 a été révélée par immunocytochimie. Pour chaque champ photographié au microscope confocal, la fraction d'Atg16L1 localisée à la membrane plasmique a été évaluée.

Les données représentent les moyennes ± SEM de 15 champs photographiques par groupe expérimental. Analyses statistiques : Mann-Whitney. *P < 0,05.

```
MTDDKDVLRD VWFGRIPTCF TLYQDEITER EAEPYYLLLP RVSYLTLVTD
KVKKHFQKVM RQEDISEIWF EYEGTPLKWH YPIGLLFDLL ASSSALPWNI
TVHFKSFPEK DLLHCPSKDA IEAHFMSCMK EADALKHKSQ VINEMQKKDH
KQLWMGLQND RFDQFWAINR KLMEYPAEEN GFRYIPFRIY QTTTERPFIQ
KLFRPVAADG QLHTLGDLLK EVCPSAIDPE DGEKKNQVMI HGIEPMLETP
LQWLSEHLSY PDNFLHISII PQPTD
```

Figure 30 : La séquence protéique humaine de l'Atg5 possède deux sites potentiels d'interaction avec l'AP2. Une analyse de la séquence protéique de la protéine Atg5 révèlent un motif consensus d'interaction avec l'AP2 : [E/D]xxxL[L/I] (**en rouge**). Un motif de liaison, non canonique, à l'AP2, initialement identifié dans la séquence du récepteur $P2X_4$, (Royle *et al*., 2002) est également retrouvé dans la séquence de l'Atg5 (**en vert**).

Plusieurs études récentes démontrent un rôle essentiel du complexe AP2 dans la machinerie autophagique. En effet, bien que l'endocytose de l'Atg16L1 et de l'Atg9 ne se fasse pas dans les mêmes invaginations membranaires (Puri *et al*., 2013), des expériences d'ARN interférence indiquent que le complexe AP2 est également essentiel à l'endocytose de l'Atg9 (Popovic & Dikic, 2014 ; Puri *et al*., 2013). Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'AP2 pouvait directement interagir avec la protéine LC3, *via* un motif LIR. Ces travaux suggèrent que le complexe AP2 pourrait, au même titre que les protéines p62 ou NBR1, constituer un nouveau récepteur de l'autophagie sélective. En interagissant avec le complexe AP2, certaines protéines membranaires, telles que les intégrines, serait recrutées dans les endosomes pré-autophagiques, et ainsi orientées vers une dégradation autophagique. Selon cette hypothèse, une inhibition de la synthèse des endosomes pré-autophagiques par les RCPG chimiotactiques, constituerait alors un évènement critique permettant l'accumulation sélective de certaines protéines au front de migration.

1.2. Rôle essentiel des calpaïnes dans les effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques

Les calpaïnes sont des modulateurs bien caractérisés de l'autophagie. L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre la calpaïne 1 est capable de stimuler l'activité autophagique, en induisant une augmentation des niveaux de LC3-II et du complexe Atg5-

Atg12 (Xia *et al*., 2010). De plus, Yousefi *et al*., (2006), ont démontré que l'Atg5 peut être clivée, *in vitro*, par les calpaïnes 1 et 2. Des expériences similaires ont plus tard permis d'identifier les protéines Atg3, Atg4, Atg7, Atg9, Atg10, Atg12 et Beclin-1 comme étant des substrats des calpaïnes (Norman *et al*., 2010). Il est intéressant de noter que les calpaïnes peuvent également cibler des protéines non autophagiques, telles que l'AP2 et PICALM, impliquées dans la formation d'endosomes pré-autophagiques (Ando *et al*., 2013 ; Kim & Kim 2001 ; Rudinski *et al*., 2009). Enfin, de précédents travaux, réalisés sur des cultures d'interneurones, avaient déjà démontré un rôle essentiel des calpaïnes dans la migration chimiotactique induite par le CXCR4 (Lysko *et al*., 2014). Nous nous sommes alors interrogés sur le rôle de ces protéases dans les effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques. Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'inhibition des calpaïnes bloque tous les effets anti-autophagiques du CXCR4 et de l'UT, à savoir leur capacité à inhiber *i)* le recrutement de l'Atg5 à la membrane plasmique, *ii)* le recrutement de l'Atg16L1 sur des vésicules d'endocytose et *iii)* la formation d'autophagosomes matures LC3-positifs. De plus, l'inhibition des calpaïnes, ou la surexpression de l'Atg5, bloque également les effets pro-migratoires des deux RCPG.

Malgré de précédentes études proposant l'Atg5 comme substrat des calpaïnes, nous ne sommes pas parvenus à démontrer un clivage de cette protéine suite à l'activation du CXCR4 ou de l'UT dans notre modèle expérimental. Il est possible que seule une faible fraction d'Atg5, associée à la membrane plasmique, subisse un clivage. Les produits de clivage pourraient également être très instables, ce qui rendrait leur détection difficile. Afin de tester l'hypothèse d'un clivage direct de l'Atg5 suite à l'activation des RCPG chimiotactiques, nous avons produit une forme mutée de cette protéine, par le retrait de six acides aminés entourant le site de clivage. Les travaux de Yousefi *et al.* (2006) avaient démontré que cette mutation rendait la protéine Atg5 résistante à un clivage par les calpaïnes 1 et 2. Des premières expériences révèlent que, suite à l'activation des deux RCPG, les taux d'Atg5 sauvage localisés à la membrane plasmique sont significativement diminués, alors que ceux de l'Atg5 mutée ne semblent pas être affectés (Fig. 31). Ce résultat préliminaire suggère donc un clivage direct de l'Atg5 par les calpaïnes. Cependant, des expériences de Western blot (résultats non illustrés) indiquent que l'Atg5 mutée est incapable de se conjuguer à l'Atg12. Ce mutant devra donc être caractérisé davantage avant que nous puissions en tirer des conclusions.

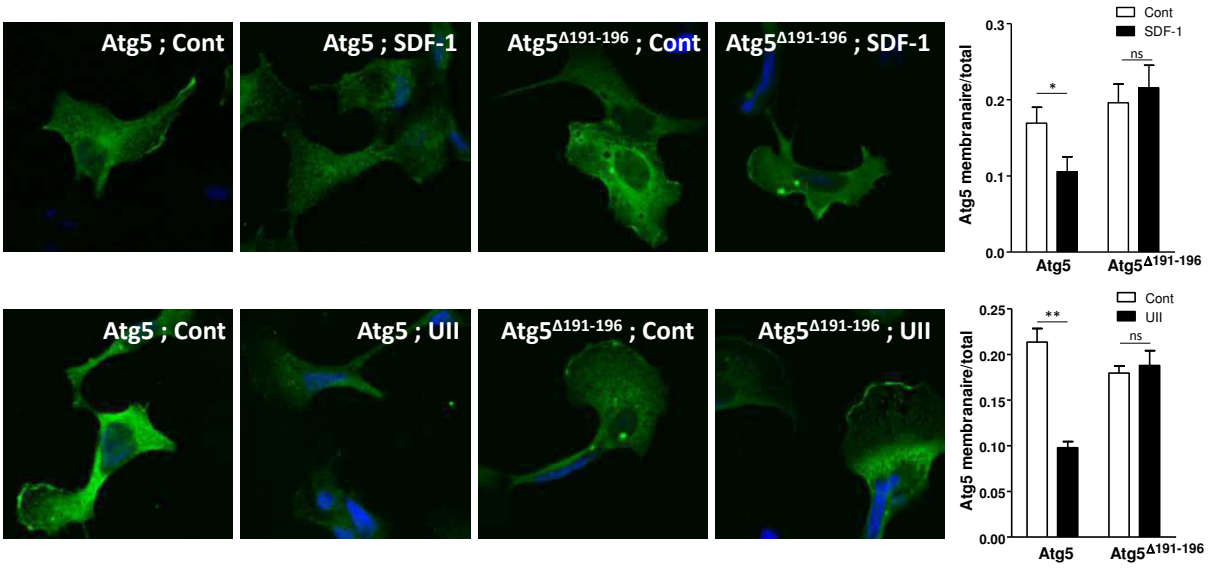


Figure 31 : L'activation du CXCR4 et de l'UT ne module pas la localisation membranaire d'une forme mutée de l'Atg5, résistante au clivage par les calpaïnes. Des cellules HEK-293 exprimant le CXCR4 (panneau supérieur) ou l'UT (panneau inférieur), ainsi que la protéine MYC-Atg5 ou la forme mutée MYC-Atg5$^{\Delta 191\text{-}196}$, ont été incubées (1 h) en absence ou en présence de SDF-1 (10^{-8} M) ou d'UII (10^{-9} M). Au terme du traitement, les cellules ont été fixées et la protéine Atg5 a été révélée par immunocytochimie. Pour chaque champ photographié au microscope confocal, la fraction d'Atg5 localisée à la membrane plasmique a été évaluée. Les données représentent les moyennes ± SEM de 15 champs photographiques par groupe expérimental. Analyses statistiques : Mann-Withney. **P < 0,01 ; *P < 0,05 ; ns, non différent statistiquement.

La genèse d'un influx calcique au front de migration, permettant l'activation localisée des calpaïnes, semble être un processus indispensable à la migration cellulaire. L'identification des canaux relayant ces influx calciques a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, les travaux de Wei *et al.*, (2009) ont permis de mettre en évidence une activité de « *flickering* » (flashs calciques transitoires et localisés) au front de migration des fibroblastes, dépendant de l'activité des canaux de type TRP, mécano-sensibles. Dans les cellules HT1080, les canaux de type TRP et de type T semblent être impliqués dans l'initiation et la propagation, respectivement, d'une vague calcique au front de migration. L'inhibition pharmacologique de l'un ou l'autre de ces canaux calciques bloque totalement la capacité migratoire de ces cellules (Huang *et al.*, 2004). Par la chélation du calcium extracellulaire, grâce à l'EGTA, nous avons démontré qu'un influx calcique est également nécessaire à l'action des calpaïnes sur la localisation membranaire de l'Atg5. Afin d'approfondir la compréhension de ce mécanisme, nous nous sommes interrogés sur l'implication des canaux de type T dans ce phénomène. Nous avons donc réalisé des expériences préliminaires avec un

inhibiteur de ces canaux calciques, le mibéfradil. En absence de mibéfradil, nous observons, comme précédemment, une diminution du pool d'Atg5 à la membrane plasmique, suite à l'activation du CXCR4 ou de l'UT, alors que ces effets sont bloqués en présence de mibéfradil (Fig. 32). Ces résultats initiaux suggèrent que les canaux calciques de type T sont un relais essentiel dans les effets anti-autophagiques des RCPG. Il conviendra de compléter notre étude pharmacologique par l'utilisation d'ARN interférents, afin d'identifier les isoformes des canaux de type T relayant les effets anti-autophagiques du CXCR4 et de l'UT.

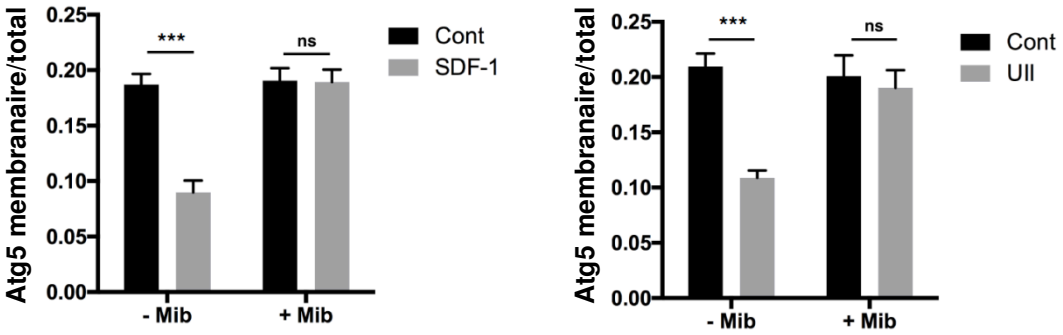


Figure 32 : Les effets du CXCR4 et de l'UT sur la localisation membranaire de l'Atg5 dépendent des canaux calciques de type T. Des cellules HEK-293 exprimant la protéine MYC-Atg5, ainsi que le CXCR4 ou l'UT, ont été incubées (1 h) en absence ou en présence de mibéfradil (10^{-6} M) et de SDF-1 (10^{-8} M) ou d'UII (10^{-9} M). Au terme du traitement, les cellules ont été fixées et la protéine MYC-Atg5 a été révélée par immunocytochimie. Pour chaque champ photographié au microscope confocal, la fraction de protéine MYC-Atg5 localisée à la membrane plasmique a été évaluée. Les données représentent les moyennes ± SEM de 15 champs photographiques par groupe expérimental. Analyses statistiques : Mann-Withney. ***P < 0,001 ; ns, non différent statistiquement.

Quelle que soit la cible des calpaïnes, les résultats présentés ici constituent, à notre connaissance, la première démonstration d'une modulation de l'autophagie suite à l''activation de ces protéases par des RCPG chimiotactiques. Il est envisageable que cette voie anti-autophagique, activée par le CXCR4 et l'UT, puisse être partagée par d'autres récepteurs chimiotactiques. En effet, la migration cellulaire induite par plusieurs récepteurs chimiotactiques, tels que les récepteurs tyrosine kinase EGF et VEGF (Glading *et al.*, 2004 ; Glading *et al.*, 2000 ; Shiraha *et al.*, 2002 ; Su *et al.*, 2006), ou le RCPG du N-formylmethionine-leucyL-phenylalanine (Nuzzi *et al.*, 2007), dépend étroitement de l'activation des calpaïnes. Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, la régulation spatiale des calpaïnes est impliquée dans plusieurs aspects de la migration chimiotactique, dont la formation de protrusions membranaires et la dynamique des complexes d'adhésion

(Franco *et al.*, 2005). Il serait alors intéressant d'étendre notre étude à un plus large panel de récepteurs, de type RCPG ou tyrosine kinase, afin de tester si la répression de l'autophagie par les calpaïnes représente une caractéristique fondamentale du chimiotactisme.

1.3. Voies de couplage des RCPG chimiotactiques, en amont des calpaïnes

Les résultats préliminaires, non publiés, présentés dans ce paragraphe, suggèrent un rôle essentiel de la protéine G_i et d'une inhibition de la PKA dans les effets anti-autophagiques des RCPG chimiotactiques.

Implication de la protéine G_i

Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, la protéine G_i est un premier relais essentiel dans la migration induite par les RCPG (Cotton *et al.*, 2009). L'activation de la sous-unité α_i mène à l'inhibition de l'AC, entrainant alors une réduction des taux d'AMPc, et donc, l'inhibition de la PKA. Au cours de la migration, cette voie permet alors de lever l'inhibition de la PKA sur des protéines cibles, telles que la MLCK (Burdyga *et al.*, 2013 ; Shiraha *et al.*, 2002). Les sous-unités $G_{\beta\gamma}$, quant à elles, peuvent stimuler la PI3K-I, essentielle à l'activation des Rho GTPAses. Afin d'évaluer l'implication de la sous-unité α_i dans les effets anti-autophagiques des RCPG, nous avons traité les cellules HEK-293 en présence de toxine pertussique (PTX). Cette toxine bactérienne catalyse l'ADP-ribosylation de cette sous-unité, inhibant alors la cascade de signalisation se trouvant en aval (Kaslow *et al.*, 1992). Les résultats obtenus indiquent que l'inhibition de la sous-unité α_i bloque totalement les effets inhibiteurs de l'UT sur la biogénèse des autophagosomes (Fig. 33A).

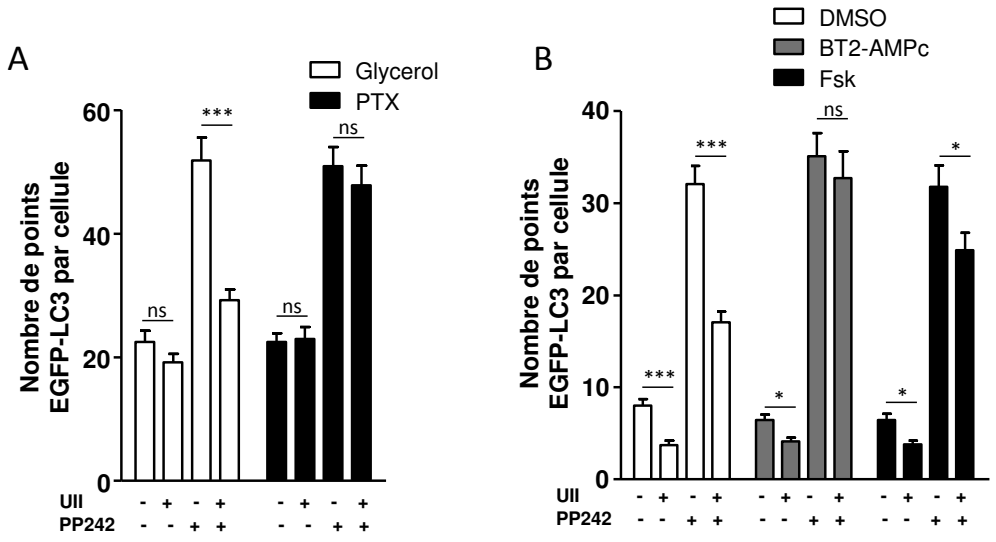


Figure 33 : Les effets anti-autophagiques du CXCR4 et de l'UT sont relayés par la voie G_i/AC/PKA. Des cellules HEK-293 exprimant le CXCR4 ou l'UT, ainsi que la protéine de fusion EGFP-LC3 ont été incubées (6 h) en absence ou en présence d'UII (10^{-9} M), de PP242 (10^{-6} M), et de **(A)** PTX (0,2 µg/ml), ou de **(B)** BT2-AMPc (10^{-3} M), et de Forskoline (10^{-6} M). Au terme des traitements, les cellules ont été fixées et observées en microscopie confocale. Le nombre de points EGFP-LC3 a ensuite été évalué. Les données représentent les moyennes ± SEM de 100 cellules par groupe expérimental. Analyses statistiques : *t*-test ***P < 0,001 ; *P < 0,05 ; ns, non différent statistiquement.

Implication de la PKA

L'activation de la sous-unité α_i peut stimuler la migration cellulaire par la voie canonique AC/PKA. Cependant, comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, la sous-unité α_i peut également stimuler la migration cellulaire par une voie non canonique, en interagissant directement avec l'une des GEF de Rac1, ELMO1. Cette interaction semble être indispensable à l'activation de Rac1, ainsi qu'au chimiotactisme induit par le CXCR4, dans un lignée cellulaire issue d'un cancer du sein (Li *et al*., 2013). Dans une première approche, nous avons testé l'implication de la voie canonique AC/PKA, par l'utilisation de la forskoline, un activateur de l'AC, ou par une surcharge d'un analogue perméant de l'AMPc, le dibutyryl-AMPc (BT2-AMPc). Comme illustré dans la figure 33B, ces deux stratégies bloquent totalement les effets inhibiteurs de l'UT sur la biogenèse des autophagosomes.

Modèle d'activation de la calpaïne 2 par les RCPG chimiotactiques

Nous avons démontré que l'activation du CXCR4 et de l'UT augmente l'activité des calpaïnes et provoque le recrutement de la calpaïne 2 à la membrane plasmique. L'activité de cette protéase est essentielle aux effets anti-autophagiques et pro-migratoires des deux RCPG. Il est concevable que ces effets puissent également être relayés par les kinases ERK et PKA puisque ces deux enzymes *i)* se trouvent en aval de la protéine G_i (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007 ; Fig. 34) et *ii)* travaillent conjointement afin de moduler l'activité de la calpaïne 2. En effet, la phosphorylation de la sérine en position 50, par la voie ERK/MAPK, augmente l'activité protéolytique de la calpaïne 2 (Glading *et al*., 2004). A l'inverse, les phosphorylations de la sérine 369 et de la thréonine 370 par la PKA réduisent son activité (Shiraha *et al*., 2002). De manière intéressante, ces phosphorylations ne semblent pas directement réguler l'activité de la calpaïne 2, mais modulent son affinité pour le PIP_2. Ainsi, la calpaïne 2 phosphorylée sur son site ERK, et déphosphorylée sur ses sites PKA, présente une conformation favorisant sa liaison à la membrane plasmique, où son activité est maximale (Shao *et al*., 2006). Sur la base de ces données, nous avons entrepris la production de deux

formes mutées de la calpaïne 2 afin de mieux comprendre son mode d'activation par les RCPG. La production d'un mutant non phosphorylable sur le site ERK a pour but de bloquer le recrutement à la membrane plasmique de la calpaïne 2, tandis qu'un mutant non phosphorylable sur les sites PKA pourrait mettre en évidence un éventuel recrutement de la calpaïne 2 à la membrane plasmique et un effet anti-autophagique, indépendamment de l'activation des RCPG chimiotactiques (Fig 35).

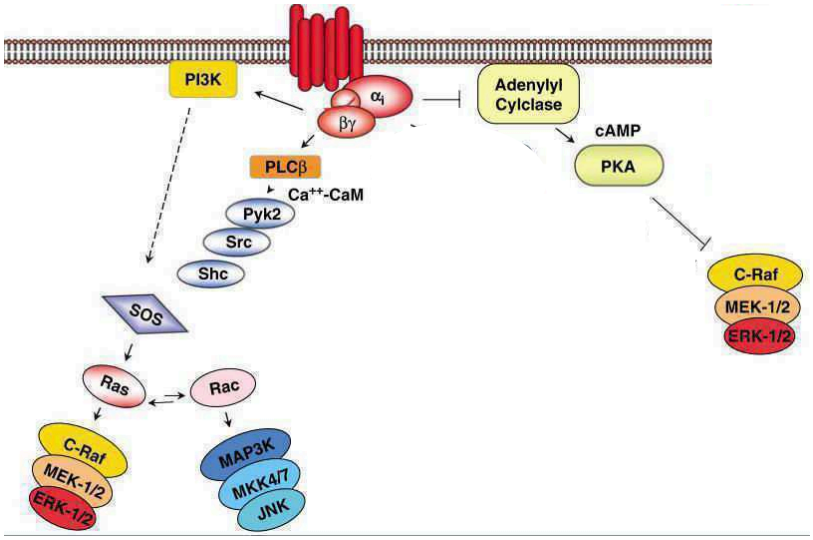


Figure 34 : Modulation de la PKA et de la voie MAPK/ERK par la protéine G_i. En conditions basales, la PKA exerce un effet inhibiteur sur les protéines de la voie MAPK/ERK. L'activation d'un RCPG stimule la sous-unité α_i, menant alors à une l'inhibition de l'AC, et donc de la PKA. Les sous-unités βγ permettent de stimuler la PI3K-I, elle-même activatrice de la voie MAPK/ERK. Adapté de Goldsmith & Dhanasekaran, 2007.

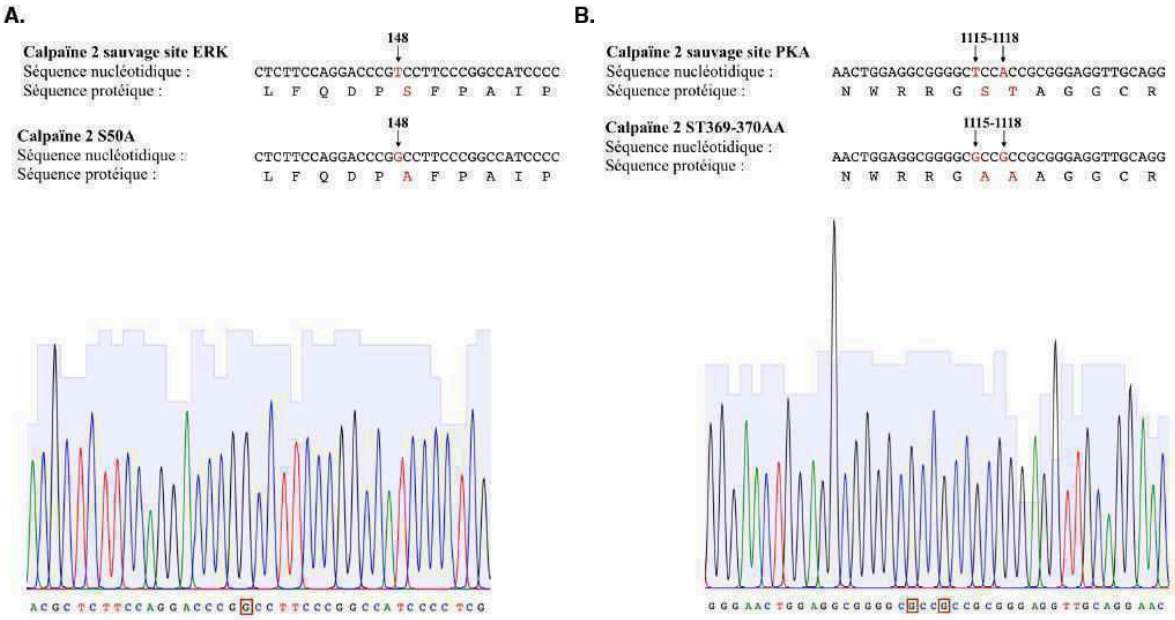


Figure 35 : Représentation des séquences, nucléotidiques et protéiques, de la calpaïne 2 sauvage, et mutée sur les sites de phosphorylation par ERK et la PKA. (A) Le résidu sérine, en position 50 (site ERK) a été substitué par un résidu alanine. **(B)** Les résidus sérine, en position 369, et thréonine en position 370, ont été substitués par une alanine. Les chromatogrammes de séquençage ont été effectués par la compagnie GATC Biotech.

2. Conséquences potentielles d'une modulation de l'autophagie par les RCPG chimiotactiques

2.1. Compétition pour une source commune de membrane

Au cours de la migration chimiotactique, l'expansion du lamellipode, à l'avant de la cellule, nécessite un apport supplémentaire de membrane, *via* une exocytose polarisée (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998 ; Schmoranzer *et al*., 2003). Les travaux de Veale et al. (2010) ont identifié les endosomes de recyclage VAMP3-positifs comme étant une importante source de membrane, s'incorporant au lamellipode lors de la migration des macrophages (Veale *et al*., 2010). Pour ce faire, la R-SNARE VAMP3 doit former un complexe avec son partenaire Q-SNARE, Stx4/SNAP23, localisé à la surface cellulaire. La perte de l'un ou l'autre de ces acteurs inhibe la formation du lamellipode et altère la migration cellulaire. Parallèlement à l'incorporation de phospholipides supplémentaires, ce mécanisme permet le recyclage, au front de migration, des protéines d'adhésion, telles que les intégrines (Veale e*t al*., 2010). La protéine SNX18 a récemment été identifiée comme étant un régulateur positif de l'autophagie. SNX18 se localise dans le compartiment périnucléaire de recyclage, et permet l'émanation de tubules Atg16L1- et la LC3-positifs, alimentant le phagophore (Knævelsrud *et al*., 2013). Sur la base de ces données, il est concevable que le compartiment périnucléaire de recyclage puisse constituer une « station de tri », délivrant des phospholipides de manière compétitive, pour l'expansion du lamellipode, ou la biogenèse des autophagosomes. L'expansion du lamellipode, déclenchée par les RCPG chimiotactiques, pourrait alors directement réduire le pool de phospholipides disponibles pour l'autophagie. Comment l'activation des RCPG, à la membrane plasmique, pourrait-elle influencer le trafic de membranes au niveau du compartiment périnucléaire de recyclage ? Nous avons démontré que le CXCR4 et l'UT inhibent la formation d'endosomes pré-autophagiques Atg16L1-positives, émanant de la membrane plasmique. Ceci pourrait alors réduire le pool d'Atg16L1 dirigé vers le compartiment périnucléaire de recyclage, et limiter ainsi la coalescence des vésicules Atg16L1- et Atg9-positives. Puisque la présence de ces deux protéines au sein de ce compartiment semble être nécessaire à l'adressage de vésicules autophagiques vers le

phagophore, une inhibition de leur coalescence pourrait favoriser la formation de vésicules non-autophagiques, adressées au front de migration (Fig. 36).

2.2. Accumulation de protéines d'adhésion à l'avant de la cellule

L'apparition d'adhésions, au sein du lamellipode, ainsi que leur maturation, constituent une caractéristique fondamentale de la migration directionnelle. Nous avons démontré que la formation d'adhésions induite par le CXCR4 ou l'UT nécessite une répression de l'autophagie puisque *i)* la formation de ces adhésions est totalement bloquée par l'inhibition pharmacologique des calpaïnes ou la surexpression de l'Atg5 et *ii)* l'effet des RCPG peut être mimé par des ARN interférents ciblant l'Atg5. L'importance d'une inhibition de l'autophagie pourrait reposer sur le fait que plusieurs protéines des complexes d'adhésion sont ciblées par la machinerie autophagique. Les travaux de Tuloup-Minguez (2013) ont démontré que des vésicules contenant l'intégrine β1 peuvent être co-localisées avec la LC3. L'inhibition de l'autophagie par des ARN interférents ciblant l'Atg3 ou l'Atg5 ralentit la dégradation de l'intégrine β1 et favorise sont recyclage à la membrane plasmique. Par ailleurs, la kinase Src, une protéine signalisante essentielle des complexes d'adhésion, se relocalise rapidement des complexes d'adhésion vers les autophagosomes lors du détachement cellule-matrice (Sandilands *et al*., 2012). Plus récemment, un certain nombre de protéines d'adhésion ont été identifiées comme étant des cibles de l'autophagie sélective. C'est le cas de la paxilline, la vinculine et la zyxine qui, au cours du désassemblage des adhésions, sont dirigées vers le phagophore par le récepteur cargo NBR1. De plus, la paxilline possède son propre motif LIR, lui permettant d'interagir directement avec la LC3 (Sharifi *et al*., 2016).

En accord avec un rôle de l'autophagie dans le désassemblage des complexes d'adhésion, il a été démontré qu'une inhibition globale de l'autophagie par des ARN interférents ciblant les protéines Atg entraine l'accumulation d'adhésions larges et inefficaces qui entravent la migration (Kenific *et al*., 2016 ; Sharifi *et al*., 2016). Ces derniers résultats pourraient paraitre en contradiction avec nos travaux, démontrant que l'inhibition de l'autophagie est nécessaire au chimiotactisme induit par le CXCR4 ou l'UT. Il faudrait cependant faire preuve de prudence lors de l'interprétation d'études de migration utilisant des ARN interférents dirigés contre des protéines Atg. L'inhibition globale de l'autophagie par cette méthode pourrait mimer les effets d'une exposition des cellules à une concentration homogène de chimiokine, plutôt qu'à un gradient. Il est donc concevable que l'activation des RCPG chimiotactiques, à l'avant des cellules, permet une inhibition locale de l'autophagie

favorisant l'assemblage des complexes d'adhésion. L'autophagie pourrait alors rester active à distance des sites d'activation/signalisation des RCPG, afin de faciliter le désassemblage de larges complexes d'adhésions (Fig. 36).

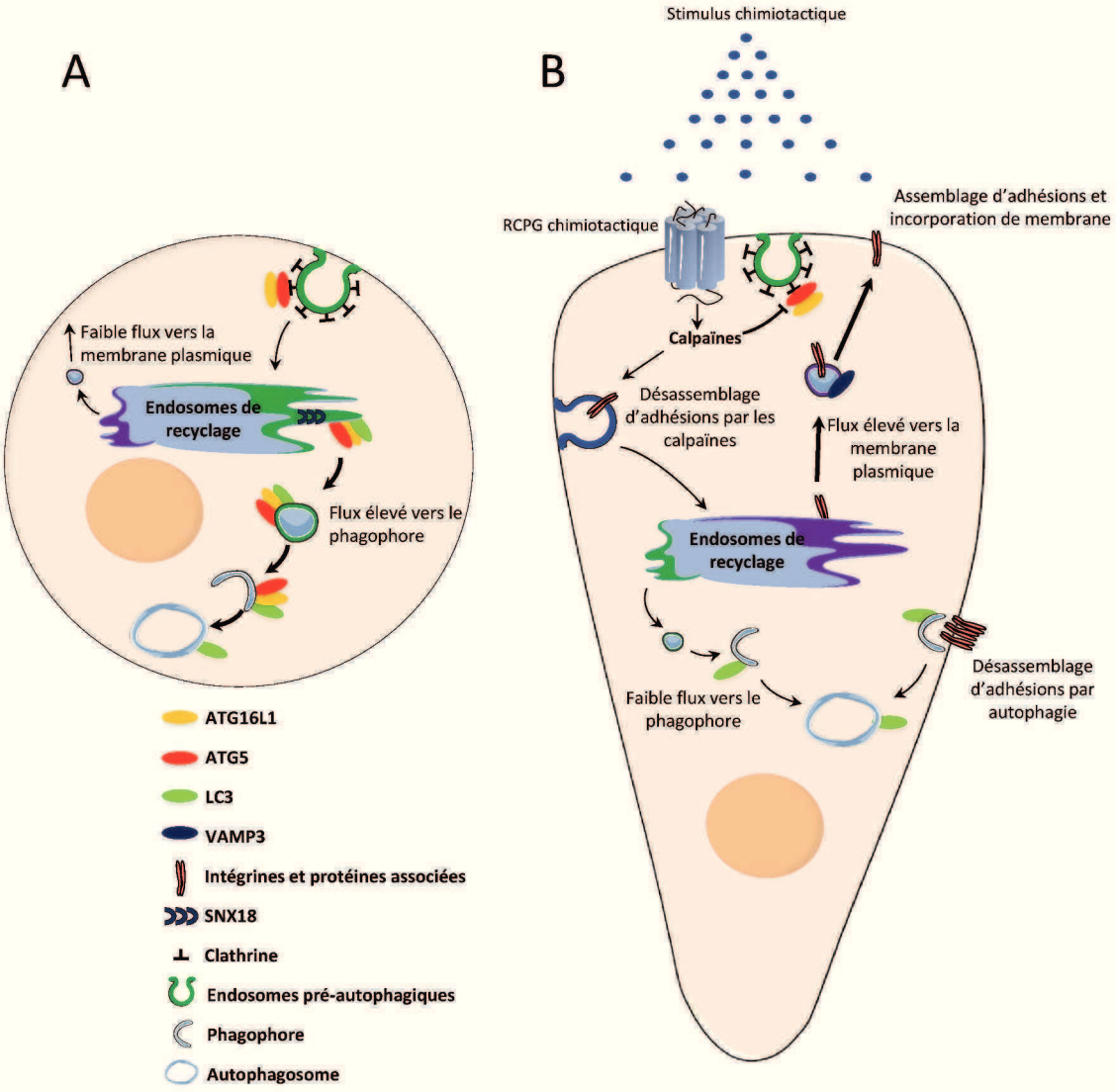


Figure 36 : Impact potentiel d'une inhibition compartimentée de l'autophagie par les RCPG chimiotactiques. (A) En conditions basales, des endosomes pré-autophagiques se forment à partir de la membrane plasmique, puis se dirigent vers le compartiment périnucléaire de recyclage. De là, des tubulations contenant l'Atg5-Atg16L1 et la LC3 se forment sous l'action de protéine SNX18, et permettent l'expansion du phagophore. **(B)** Suite à l'activation des RCPG chimiotactiques, la formation d'endosomes pré-autophagiques est inhibée. L'absence de protéines Atg dans le compartiment périnucléaire de recyclage pourrait réduire l'adressage de membrane vers le phagophore, au profit de la membrane plasmique. Cette exocytose polarisée permettrait le recyclage des intégrines, ainsi que l'incorporation de

phospholipides, essentielle à l'expansion du lamellipode. L'inhibition de l'autophagie au front de migration permettrait également de protéger les acteurs de la migration d'une dégradation autophagique. L'autophagie resterait active, à distance des RCPG chimiotactiques, afin de participer au désassemblage de larges adhésions.

2.3. Accumulation, à l'avant de la cellule, de protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine

Les récepteurs chimiotactiques activent des voies de signalisation qui coordonnent la réorganisation du cytosquelette d'actine. De manière intéressante, plusieurs protéines impliquées dans ce remodelage peuvent être dégradées par autophagie. Une analyse protéomique des précurseurs autophagiques Atg16L1-positifs a permis l'identification de plusieurs protéines clés de l'expansion du lamellipode : la twinfiline, WIPF1, la cortactine et la cofiline 1 (Morozova *et al*., 2015 ; Fig. 37). De plus, il a été démontré que la forme active de RhoA, ainsi que son activateur GEF-H1, peuvent être ubiquitinylés et reconnus par la protéine cargo p62, avant d'être dirigés vers la machinerie autophagique (Belaid *et al*., 2013 ; Yoshida *et al*., 2016). L'inhibition de l'autophagie, par des ARN interférents ciblant l'Atg5, s'accompagne d'une accumulation de RhoA et une polymérisation de l'actine sur toute la périphérie cellulaire. De manière intéressante, les travaux de Belaid *et al.* (2013) indiquent que la polymérisation intense d'actine est, en fait, délétère à l'avancée de la cellule. Ici encore, ces données suggèrent que l'inhibition de l'autophagie, par les RCPG chimiotactiques, devrait être localisée au lamellipode afin d'y concentrer les principaux acteurs de la migration cellulaire chimiotactique.

Atg16L/Annexin A2 + vesicles	Function
Actin	Vesicle trafficking
Microtubule-actin cross-linking factor 1	Vesicle trafficking
Twinfilin	Modulator of Actin polymerization
WAS/WASL interacting protein (WIPF1)	Modulator of Actin polymerization
Coronin-1	Autophagosome formation
Cortactin	Autophagosome-lysosomal fusion
Dynactin	Autophagosome movement
Cofilin 1	Modulator of Actin polymerization
AP-2 (beta and mu subunits)	Atg16L interaction
Clathrin	Atg16L interaction
Synaptotagmin II	Endocytosis
Synaptojanin 2	PI(4,5)P2 hydrolysis
Endophilin A3	Endocytosis; vesicular transport
Annexin A2	Lipid segregation (PS and PIs)
Protein S100A11	Annexin A2-binding partner
ASAP2	ARF6 regulator
Vesicle-fusing ATPase	Vesicle trafficking
ARF6	PIP2 formation via PIP5K; PLD Inhibition
Girdin	Autophagy regulator
VAMP 7	SNARE
VAMP 3	SNARE
VtiB	SNARE
Ubiquitin	Binding to Atg16L
Galectin 3	Endocytosis
Aurora A kinase	Autophagy regulators
Vps 13c	Endocytosis; Regulation PI phosphates
Hrb	VAMP 7 adaptor

Figure 37 : Analyse protéomique des endosomes pré-autophagiques Atg16L1-positifs. Les flèches indiquent des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Extrait de (Morozova *et a*l., 2015).

2.4. Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse

D'autres mécanismes, liés à la régulation de l'autophagie, pourraient permettre d'amplifier les propriétés pro-migratoires des RCPG chimiotactiques. Nous avons constaté que l'inhibition du flux autophagique, suite à l'activation du CXCR4 et de l'UT, induit une accumulation cytosolique de la protéine p62. Grâce à son motif LIR, p62 agit comme un récepteur cargo, contribuant à la dégradation autophagique de divers substrats, tels que des agrégats de protéines ubiquitinées (Pankiv *et al*., 2007) et des mitochondries (Razi *et al*., 2009). Récemment, un rôle de p62 a été démontré dans les processus de migration. En effet, p62 peut directement lier et protéger le facteur de transcription Twist1, un régulateur de la TEM, d'une dégradation par le protéasome (Qiang *et al*., 2014). Grâce à ce complexe p62-Twist1, les cellules cancéreuses ayant un défaut d'autophagie déclenchent la TEM, ce qui renforce leur phénotype invasif (Qiang *et al*., 2014). De plus, des données récentes obtenues dans le glioblastome indiquent que l'inhibition de l'autophagie, par une délétion de l'Atg5 ou de l'Atg7, stimule l'expression des régulateurs de la TEM, SNAIL et SLUG, ainsi que l'invasion cellulaire (Catalano *et al*., 2015). Il est alors envisageable que l'inhibition de

l'autophagie par des RCPG chimiotactiques contribue à des événements impliqués dans la TEM, lors de la progression tumorale. D'autres études seront nécessaires afin d'adresser ce point.

Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans cette étude s'inscrit dans la thématique de l'équipe Astrocytes et Niche Vasculaire. L'un des objectifs de notre équipe est d'apporter un certain éclairage sur les mécanismes contrôlant la migration cellulaire, dans le contexte de l'invasion tumorale. Le but de ce travail était d'étudier l'implication du processus autophagique dans la migration chimiotactique. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence le contrôle des processus autophagiques, par des RCPG chimiotactiques, et démontrer l'importance de cette modulation pour une migration directionnelle efficace.

Nous avons démontré que deux RCPG chimiotactiques, le CXCR4 et l'UT, peuvent ralentir la biogenèse des autophagosomes, en inhibant la formation d'endosomes pré-autophagiques Atg16L1-positifs émanant de la membrane plasmique. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle cette inhibition est compartimentée à l'avant des cellules en migration, sous l'effet de l'activation locale des récepteurs. Cet évènement permettrait l'accumulation de phospholipides, ainsi que de protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, et la dynamique des adhésions. De précédents travaux, réalisés sur des cellules de glioblastome en migration, avaient démontré une absence d'invaginations AP2-positives à la face ventrale du lamellum/lamellipode (Kural *et al*., 2015). Le rôle central de l'AP2 dans la formation des endosomes pré-autophagiques (Puri *et al*., 2013; Ravikumar *et al*., 2010), suggère qu'une répression des invaginations contenant l'Atg16L1-Atg5, pourrait également être observable au cours de la migration. Afin de tester cette hypothèse, nous envisageons de suivre la formation d'endosomes pré-autophagiques dans des cellules polarisées. La densité de vésicules contenant les protéines Atg16L1-Atg5, fusionnées à des protéines fluorescentes, pourra être évaluée sur de longues durées grâce à des techniques de microscopie confocale à disque rotatif.

Par la suite, nous chercherons à identifier les protéines s'accumulant à la membrane plasmique, suite à l'inhibition de l'autophagie par les RCPG chimiotactiques. Parmi les candidats potentiels, nous ciblerons les protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine ; RhoA, la cortactine et la cofiline 1, ainsi que les protéines d'adhésion ; la vinculine, la zyxine et la paxilline. Une purification des endosomes pré-autophagiques, suivie d'une analyse protéomique exhaustive des vésicules Atg16L-Atg5 nous aidera à identifier d'autres protéines impliquées dans la migration chimiotactique, et

potentiellement dégradées par autophagie. Par des techniques de microscopie confocale, nous suivrons la localisation de ces protéines en conditions basales, ou suite à l'activation des RCPG chimiotactiques, et rechercherons une co-localisation de ces protéines avec les endosomes pré-autophagiques Atg16L1-Atg5-positifs. Nous avons démontré que des ARN interférents dirigés contre l'Atg5 miment partiellement les effets d'une exposition des cellules à une concentration homogène de SDF-1 ou d'UII, en augmentant le nombre de complexes d'adhésion par cellule. Nous chercherons donc à savoir si ces ARN interférents suffisent pour engendrer une accumulation membranaire des différents acteurs de la migration. L'ensemble de ces expériences pourraient donc nous aider à confirmer l'hypothèse d'une autophagie compartimentée par les RCPG chimiotactiques, afin de favoriser la migration cellulaire. Une régulation spatiale de l'autophagie pourrait donc se situer en amont des évènements précoces du chimiotactisme, tels que le recrutement de RhoA à la périphérie cellulaire, ou l'arrivée de la paxilline aux adhésions naissantes. L'autophagie pourrait alors être considérée comme partie intégrante de la mise en place de la « boussole cellulaire », au même titre que l'activation de la PI3K-I, et constitue donc une nouvelle voie d'investigation dans les processus d'invasion cellulaire pathologiques.

Finalement, nous évaluerons, *in vivo*, l'impact du processus autophagique sur les propriétés pro-invasives des cellules de gliomes, par la réalisation de xénogreffes orthotopiques de lignées gliomales invasives, chez la Souris *Nude*. Les expériences que nous avons réalisées dans des chambres de Boyden, indiquent que la surexpression de la protéine Atg5 bloque totalement la migration des cellules U87 vers un stimulus chimiotactique. Par la greffe de cellules U87 surexprimant l'Atg5 de manière stable, nous espérons également bloquer leur capacité à envahir le parenchyme sain. Nous envisageons également d'étudier la relation entre les calpaïnes et l'activité autophagique, *in vivo*. Dans le contexte du cancer, l'activité des calpaïnes est souvent altérée afin de faciliter la tumorigenèse. Il a été démontré que des ARN interférents, ciblant la calpaïne 2, peuvent ralentir la dissémination de cellules U87 dans des coupes de cerveau de souris (Lal *et al*., 2012). Par ailleurs, le développement d'inhibiteurs des calpaïnes, pouvant limiter la dissémination des cellules cancéreuses et la formation de métastases, est aujourd'hui une stratégie thérapeutique en plein essor (Leloup & Wells, 2011; Storr *et al*., 2011). En plus d'agir sur les protéines du remodelage de l'actine et de l'adhésion, inhiber la calpaïne pourrait avoir des effets pro-autophagiques, qui selon le contexte tumoral, pourrait également être un facteur de bon pronostic. Suite à l'administration d'inhibiteurs des calpaïnes, *in vivo*, il serait intéressant de vérifier si la

répression du pouvoir invasif des cellules cancéreuses est associée à une augmentation de la biogenèse des autophagosomes, évaluée par l'immundétection de la protéine LC3-II sur des coupes de cerveaux xénogreffés. Ces études contribueraient à établir une corrélation entre le pouvoir invasif des cellules de gliome, et leur activité autophagique. Il est concevable que les cellules les plus infiltrantes, soient également les moins autophagiques.

En résumé, les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, la régulation de l'autophagie par les RCPG chimiotactiques. Ces données révèlent de nouvelles pistes de réflexion quant au le rôle crucial, et souvent controversé, de l'autophagie dans la migration cellulaire. Sur la base de ces résultats, la machinerie autophagique pourrait devenir cible thérapeutique importante, afin d'optimiser les stratégies déjà existantes contre les tumeurs invasives et les métastases.

Références bibliographiques

-A-

Abada, A, and Elazar, Z. (2014). Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. EMBO Rep., 15, 839–852.

Abercrombie, M, Heaysman, JEM, and Pegrum, SM. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. Exp. Cell Res., 67, 359–367.

Ahmed, S, Goh, WI, and Bu, W. (2010). I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. Semin. Cell Dev. Biol., 21, 350–356.

Alessi, DR, James, SR, Downes, CP, Holmes, AB, Gaffney, PR, Reese, CB, and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Bα. Curr. Biol., 7, 261–269.

Ames, RS, Sarau, HM, Chambers, JK, Willette, RN, Aiyar, NV, Romanic, AM, Louden, CS, Foley, JJ, Sauermelch, CF, Coatney, RW, Ao, Z, Disa, J, Holmes, SD, Stadel, JM, Martin, JD, Liu, WS, Glover, GI, Wilson, S, McNulty, DE, Ellis, CE, Elshourbagy, NA, Shabon, U, Trill, JJ, Hay, DW, Ohlstein, EH, Bergsma, DJ, and Douglas, SA. (1999). Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. Nature, 401, 282–286.

Antonescu, CN, Aguet, F, Danuser, G, and Schmid, SL. (2011). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. Mol. Biol. Cell, 22, 2588–2600.

Arico, S, Petiot, A, Bauvy, C, Dubbelhuis, PF, Meijer, AJ, Codogno, P, and Ogier-Denis, E. (2001). The Tumor Suppressor PTEN Positively Regulates Macroautophagy by Inhibiting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway. J. Biol. Chem., 276, 35243–35246.

Arjonen, A, Alanko, J, Veltel, S, and Ivaska, J. (2012). Distinct recycling of active and inactive β1 integrins. Traffic, 13, 610–625.

Axe, EL, Walker, SA, Manifava, M, Chandra, P, Roderick, HL, Habermann, A, Griffiths, G, and Ktistakis, NT. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol., 182, 685–701.

-B-

Backer, JM. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. Biochem. J., 410, 1–17.

Baerga, R, Zhang, Y, Chen, PH, Goldman, S, and Jin, S. (2009). Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. Autophagy, 5, 1118–1130.

Bear, JE, and Gertler, FB. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. J. Cell Sci., 122, 1947–1953.

Belaid, A, Ndiaye, PD, Cerezo, M, Cailleteau, L, Brest, P, Klionsky, DJ, Carle, GF, Hofman, P, and Mograbi, B. (2014). Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again: emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins. Autophagy, 10, 201–208.

Bellot, G, Garcia-Medina, R, Gounon, P, Chiche, J, Roux, D, Pouysségur, J, and Mazure, NM. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. Mol. Cell Biol., 29, 2570–2581.

Berg, TO, Fengsrud, M, Strømhaug, PE, Berg, T, and Seglen, PO. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. J. Cell Biol., 273, 21883–21892.

Bhatt, A, Kaverina, I, Otey, C, and Huttenlocher, A. (2002). Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. J. Cell Sci., 115, 3415–3425.

Bialkowska, K, Kulkarni, S, Du, X, Goll, DE, Saido, TC, and Fox, JEB. (2000). Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. J. Cell Biol., 151, 685–695.

Bjørkøy, G, Lamark, T, Brech, A, Outzen, H, Perander, M, Øvervatn, 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. J. Cell Biol., 171, 603–614.

Blackburn, J, and Mansell, JP. (2012). The emerging role of lysophosphatidic acid (LPA) in skeletal biology. Bone, 50, 756–762.

Blagosklonny, MV. (2010). Linking calorie restriction to longevity through sirtuins and autophagy: any role for TOR. Cell Death Dis., 1, 12–15.

Böttcher, RT, Stremmel, C, Meves, A, Meyer, H, Widmaier, M, Tseng, H, and Fässler, R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of β1 integrins by binding to the β1-integrin tail. Nat. Cell Biol., 14, 584–592.

Bretscher, MS. (1996). Moving membrane up to the front of migrating cells. Cell, 85, 465–467.

Bretscher, MS, and Aguado-Velasco, C. (1998). Membrane traffic during cell locomotion. Curr. Opin. Cell Biol., 10, 537–541.

Bridgewater, RE, Norman, JC, and Caswell, PT. (2012). Integrin trafficking at a glance. J. Cell Sci., 125, 3695–3701.

Brown, MC, Perrotta, JA, and Turner, CE. (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. J. Cell Biol., 135, 1109–1123.

Brugarolas, J, Lei, K, Hurley, RL, Manning, BD, Reiling, JH, Hafen, E, Witters, LA, Ellisen, LW, and Kaelin Jr, WG. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia

by REDD1 and the TSC1 / TSC2 tumor suppressor complex. Genes Dev., 18, 2893–2904.

Brulé, C, Perzo, N, Joubert, JE, Sainsily, X, Leduc, R, Castel, H, and Prézeau, L. (2014). Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. FASEB J., 28, 5148–5162.

Burdyga, A, Conant, A, Haynes, L, Zhang, J, Jalink, K, Sutton, R, Neoptolemos, J, Costello, E, and Tepikin, A. (2013). CAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: effects of PKA and EPAC. Biochim. Biophys. Acta, 1833, 2664–2672.

-C-

Campbell, ID, and Humphries, MJ. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 3, 1–15.

Carragher, NO, Westhoff, MA, Fincham, VJ, Schaller, MD, and Frame, MC. (2003). A Novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. Curr. Biol., 13, 1442–1450.

Catalano, M, D'Alessandro, G, Lepore, F, Corazzari, M, Caldarola, S, Valacca, C, Faienza, F, Esposito, V, Limatola, C, Cecconi, F, and Di Bartolomeo, S. (2015). Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. Mol. Oncol., 9, 1612–1625.

Chan, EYW, Kir, S, and Tooze, SA. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. J. Biol. Chem., 282, 25464–25474.

Chan, EYW, Longatti, A, McKnight, NC, and Tooze, SA. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. Mol. Cell. Biol., 29, 157–71.

Chan, KT, Cortesio, CL, and Huttenlocher, A. (2007). Integrins in Cell Migration. Harb. Perspect. Biol., 3, 47–67.

Chatterjee, S, Behnam Azad, B, and Nimmagadda, S. (2014). The intricate role of CXCR4 in cancer. Adv. Cancer Res., 124, 31–82.

Chen, L, Zhang, JJ, and Huang, XY. (2008). cAMP inhibits cell migration by interfering with Rac-induced lamellipodium formation. J. Biol. Chem., 283, 13799–13805.

Cheng, Z-J, Zhao, J, Sun, Y, Hu, W, Wu, Y-L, Cen, B, Wu, G-X, and Pei, G. (2000). β-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between β-arrestin and CXCR4. J. Biol. Chem., 275, 2479–2485.

Chesarone, MA, DuPage, AG, and Goode, BL. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 11, 62–74.

Chiang, HL, Terlecky, SR, Plant, CP, and Dice, JF. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. Science, 246, 382–385.

Choi, CK, Vicente-Manzanares, M, Zareno, J, Whitmore, LA, Mogilner, A, and Horwitz, AR.

(2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. Nat. Cell Biol., 10, 1039–1050.

Clark, SL. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 349–362.

Contos, JJ, Ishii, I, and Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid receptors. Mol. Pharmacol., 58, 1188–1196.

Cuervo, AM, and Dice, JF. (2000). Regulation of Lamp2a levels in the lysosomal membrane. Traffic, 1, 570–583.

Cuervo, AM, Hu, W, Lim, B, and Dice, JF. (1998). IkappaB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. Mol. Biol. Cell, 9, 1995–2010.

Curtis, ASG. (1964). A study by interference reflection microscopy. J. Cell Biol., 20, 199–215.

-D-

Daher, Z, Noël, J, and Claing, A. (2008). Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. Cell Signal., 20, 2256–2265.

Dall'Armi, C, Devereaux, KA, and Di Paolo, G. (2014). The role of lipids in the control of autophagy. Curr. Biol., 23, 1–26.

De Franceschi, N, Arjonen, A, Elkhatib, N, Denessiouk, K, Wrobel, AG, Wilson, TA, Pouwels, J, Montagnac, G, Owen, DJ, and Ivaska, J. (2016). Selective integrin endocytosis is driven by interactions between the integrin α-chain and AP2. Nat. Struct. Mol. Biol., 23, 172–179.

de Waal, EJ, Vreeling-Sindelarova, H, Schellens, JPM, Houtkooper, JM, and James, J. (1986). Quantitative changes in the lysosomal vacuolar system of rat hepatocytes during short-term starvation - A morphometric analysis with special reference to macro and microautophagy. Cell Tissue Res., 243, 641–648.

Degenhardt, K, Mathew, R, Beaudoin, B, Bray, K, Anderson, D, Chen, G, Mukherjee, C, Shi, Y, Fan, Y, Nelson, DA, and Jin, S. (2010). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell, 10, 51–64.

Delorme, V, Machacek, M, DerMardirossian, C, Anderson, KL, Wittmann, T, Hanein, D, Waterman-Storer, C, Danuser, G, and Bokoch, GM. (2007). Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. Dev. Cell, 13, 646–662.

Demarchi, F, Bertoli, C, Copetti, T, Tanida, I, Brancolini, C, Eskelinen, EL, and Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. J. Cell Biol., 175, 595–605.

DePasquale, JA, and Izzard, CS. (1987). Evidence for an actin-containing cytoplasmic precursor of the focal contact and the timing of incorporation of vinculin at the focal contact. J. Cell Biol., 105, 2803–2809.

Deter, RL, Baudhuin, P, and de Duve, C. (2016). Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. J. Cell Biol., 35, 11–16.

Dice, JF. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. Trends Biochem. Sci., 15, 305–309.

-E-

Eck, SM, Côté, AL, Winkelman, WD, and Brinckerhoff, CE. (2009). CXCR4 and matrix metalloproteinase-1 are elevated in breast carcinoma-associated fibroblasts and in normal mammary fibroblasts exposed to factors secreted by breast cancer cells. Mol. Cancer Res., 7, 1033–1044.

Egan, DF, Chun, MGH, Vamos, M, Zou, H, Rong, J, Miller, CJ, Lou, HJ, Raveendra-Panickar, D, Yang, C-C, Sheffler, DJ, Teriete, P, Asara, JM, Turk, BE, Cosford, NDP, and Shaw, RJ. (2015). Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. Mol. Cell, 59, 285–297.

Ezratty, EJ, Bertaux, C, Marcantonio, EE, and Gundersen, GG. (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. J. Cell Biol., 187, 733–747.

Ezratty, EJ, Partridge, MA, and Gundersen, GG. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. Nat. Cell Biol., 7, 581–590.

-F-

Fan, W, Nassiri, A, and Zhong, Q. (2011). Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 108, 7769–7774.

Federico, A, Zappavigna, S, Romano, M, Grieco, P, Luce, A, Marra, M, Gravina, AG, Stiuso, P, D'Armiento, FP, Vitale, G, Tuccillo, C, Novellino, E, Loguercio, C, and Caraglia, M. (2014). Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. Eur. J. Clin. Invest., 44, 285–294.

Feng, Y, Broder, CC, Kennedy, PE, and Berger, EA. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science, 272, 872–877.

Fong, AM, Premont, RT, Richardson, RM, Yu, Y-RA, Lefkowitz, RJ, and Patel, DD. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in β-arrestin2- and GRK6-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 7478–7483.

Franco, R, Zappavigna, S, Gigantino, V, Luce, A, Cantile, M, Cerrone, M, Facchini, G, Perdonà, S, Pignata, S, Di Lorenzo, G, Chieffi, S, Vitale, G, De Sio, M, Sgambato, A, Botti, G, Yousif, A, Novellino, E, Grieco, P, and Caraglia, M. (2014). Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility/invasion. J. Exp. Clin. Cancer Res., 33, 48–57.

Franco, S, Perrin, B, and Huttenlocher, A. (2004). Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. Exp. Cell Res., 299, 179–187.

Franco, SJ, and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. J. Cell Sci., 118, 3829–3838.

Franco, SJ, Rodgers, MA, Perrin, BJ, Han, J, Bennin, DA, Critchley, DR, and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. Nat. Cell Biol., 6, 977–983.

Frantz, C, Barreiro, G, Dominguez, L, Chen, X, Eddy, R, Condeelis, J, Kelly, MJS, Jacobson, MP, and Barber, DL. (2008). Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. J. Cell Biol., 183, 865–879.

Frantz, C, Stewart, KM, and Weaver, VM. (2010). The extracellular matrix at a glance. J. Cell Sci., 123, 4195–4200.

Fredriksson, R, Lagerström, MC, Lundin, L-G, and Schiöth, HB. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol. Pharmacol., 63, 1256–1272.

-G-

Gagliardi, F, Narayanan, A, Reni, M, Franzin, A, Mazza, E, Boari, N, Bailo, M, Zordan, P, and Mortini, P. (2014). The role of CXCR4 in highly malignant human gliomas biology: Current knowledge and future directions. Glia, 62, 1015–1023.

Ganley, IG, Lam, DH, Wang, J, Ding, X, Chen, S, and Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. J. Biol. Chem., 284, 12297–12305.

Gerisch, G, Schroth-Diez, B, Müller-Taubenberger, A, and Ecke, M. (2012). PIP3 waves and PTEN dynamics in the emergence of cell polarity. Biophys. J., 103, 1170–1178.

Glading, A, Bodnar, RJ, Reynolds, IJ, Shiraha, H, Potter, DA, Blair, HC, Wells, A, and Satish, L. (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (Calpain II), at least in part , by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation.

Glading, A, Chang, P, Lauffenburger, DA, and Wells, A. (2000). Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. J. Biol. Chem., 275, 2390–2398.

Goldsmith, ZG, and Dhanasekaran, DN. (2007). G protein regulation of MAPK networks. Oncogene, 26, 3122–3142.

Gordon, PB, and Seglen, PO. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun., 151, 40–47.

Grieco, P, Franco, R, Bozzuto, G, Toccacieli, L, Sgambato, A, Marra, M, Zappavigna, S, Migaldi, M, Rossi, G, Striano, S, Marra, L, Gallo, L, Cittadini, A, Botti, G, Novellino, E, Molinari, A, Budillon, A, and Caraglia, M. (2011). Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. J. Cell Biochem., 112, 341–353.

Grimmel, M, Backhaus, C, and Proikas-Cezanne, T. (2015). WIPI-mediated autophagy and longevity. Cells, 4, 202–217.

Grotemeier, A, Alers, S, Pfisterer, SG, Paasch, F, Daubrawa, M, Dieterle, A, Viollet, B, Wesselborg, S, Proikas-Cezanne, T, and Stork, B. (2010). AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca2+ increase. Cell. Signal., 22, 914–925.

Guo, JY, Chen, HY, Mathew, R, Fan, J, Strohecker, AM, Karsli-Uzunbas, G, Kamphorst, JJ, Chen, G, Lemons, JMS, Karantza, V, Coller, HA, DiPaola, RS, Gelinas, C, Rabinowitz, JD, and White, E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Dev., 25, 460–470.

Gupton, SL, and Gertler, FB. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. Sci. STKE, 400, 1–10.

Gwinn, DM, Shackelford, DB, Egan, DF, Mihaylova, MM, Vasquez, DS, Turk, BE, and Shaw, RJ. (2008). AMPK phosophorylation of raptor mediates a metabollic checkpoint. Mol. Cell, 30, 214–226.

-H-

Hailey, DW, Kim, PK, Satpute-Krishnan, P, Rambold, AS, Sougrat, R, and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell. Cell, 141, 656–667.

Hamasaki, M, Furuta, N, Matsuda, A, Nezu, A, Yamamoto, A, Fujita, N, Oomori, H, Noda, T, Haraguchi, T, Hiraoka, Y, Amano, A, and Yoshimori, T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. Nature, 495, 389–93.

Hanada, T, Noda, NN, Satomi, Y, Ichimura, Y, Fujioka, Y, Takao, T, Inagaki, F, and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J. Biol. Chem., 282, 37298–37302.

Hara, T, Nakamura, K, Matsui, M, Yamamoto, A, Nakahara, Y, Suzuki-Migishima, R, Yokoyama, M, Mishima, K, Saito, I, Okano, H, and Mizu. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature, 441, 885–889.

He, C, Bassik, MC, Moresi, V, Sun, K, Wei, Y, Zou, Z, An, Z, Loh, J, Fisher, J, Sun, Q, Korsmeyer, S, Packer, M, May, HI, Hill, JA, Virgin, HW, Gilpin, C, Xiao, G, Bassel-Duby, R, Scherer, PE, and Levine, B. (2012). Exercise–induced BCL2–regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. Nature, 481, 511–515.

Heath, JP, and Dunn, GA. (1978). Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. J. Cell Sci., 29, 197–212.

Hildegard, M, Zheng, B, Asara, J, and Thomas, S. (2012). AMPK-dependent phosphorylation of regulates ATG9 localization. Autophagy, 8, 1197–1214.

Hirata, H, Tatsumi, H, Lim, CT, and Sokabe, M. (2014). Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 306, 607-620.

Hosokawa, N, Hara, T, Kaizuka, T, Kishi, C, Takamura, A, Miura, Y, Iemura, S-I, Natsume, T, Takehana, K, Yamada, N, Guan, J-L, Oshiro, N, and Mizushima, N. (2009). Nutrient-

dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Mol. Biol. Cell, 20, 1981–1991.

Howes, MT, Kirkham, M, Riches, J, Cortese, K, Walser, PJ, Simpson, F, Hill, MM, Jones, A, Lundmark, R, Lindsay, MR, Hernandez-Deviez, DJ, Hadzic, G, McCluskey, A, Bashir, R, Liu, L, Pilch, P, McMahon, H, Robinson, PJ, Hancock, JF, Mayor, S, and Parton, RG. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. J. Cell Biol., 190, 675–691.

Høyer-Hansen, M, Bastholm, L, Szyniarowski, P, Campanella, M, Szabadkai, G, Farkas, T, Bianchi, K, Fehrenbacher, N, Elling, F, Rizzuto, R, Mathiasen, IS, and Jäättelä, M. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-β, and Bcl-2. Mol. Cell, 25, 193–205.

Huang, C. (2014). Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. Cell Adh. Migr., 4, 10–18.

Huang, C, Jacobson, K, and Schaller, MD. (2004). MAP kinases and cell migration. J. Cell Sci., 117, 4619–4628.

Huang, X, Bai, H-M, Chen, L, Li, B, and Lu, Y-C. (2010). Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. J. Clin. Neurosci., 17, 1515–1519.

Humphries, JD, Wang, P, Streuli, C, Geiger, B, Humphries, MJ, and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. J. Cell Biol., 179, 1043–1057.

Huveneers, S, and Danen, EHJ. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. J. Cell Sci., 122, 1059–1069.

-I-

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

Ilić, D, Furuta, Y, Kanazawa, S, Takeda, N, Sobue, K, Nakatsuji, N, Nomura, S, Fujimoto, J, Okada, M, and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. Nature, 6549, 539–544.

Insall, RH, and Weiner, OD. (2001). PIP3, PIP2, and cell movement - similar messages, different meanings? Dev. Cell, 1, 743–747.

Iozzo, RV, and Murdoch, AD. (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. FASEB J., 10, 598–614.

Itakura, E, Kishi, C, Inoue, K, and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-Kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. Mol. Biol. Cell, 19, 5360–5372.

Itakura, E, and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a

hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. Autophagy, 6, 764–776.

Izzard, CS, and Lochner, LR. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. J. Cell Sci., 21, 129–159.

-J-

Jahn, R, and Scheller, RH. (2006). SNAREs — engines for membrane fusion. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7, 631–643.

Jahreiss, L, Menzies, FM, and Rubinsztein, DC. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. Traffic, 9, 574–587.

Jarry, M, Diallo, M, Lecointre, C, Desrues, L, Tokay, T, Chatenet, D, Leprince, J, Rossi, O, Vaudry, H, Tonon, M, Prézeau, L, Castel, H, and Gandolfo, P. (2010). The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. Biochem. J., 428, 113–124.

Järveläinen, H, Sainio, A, Koulu, M, Wight, T, and Penttinen, R. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. Pharmacol Rev., 61, 198–223.

Jenkins, GM, and Frohman, MA. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. Cell. Mol. Life Sci., 62, 2305–2316.

Juhasz, G, and Neufeld, TP. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. PLoS Biol., 4, 161–164.

Jung, HS, Chung, KW, Won Kim, J, Kim, J, Komatsu, M, Tanaka, K, Nguyen, YH, Kang, TM, Yoon, KH, Kim, JW, Jeong, YT, Han, MS, Lee, MK, Kim, KW, Shin, J, and Lee, MS. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. Cell Metab., 8, 318–324.

-K-

Kalluri, R, and Weinberg, RA. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest., 119, 1420–1428.

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.

Kaslow, HR, and Burns, DL. (1992). Pertussis toxin and targt entry, and activation. FASEB J., 6, 2684–2690.

Kaverina, I, Krylyshkina, O, and Small, JV. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation. J. Cell Biol., 146, 1033–1043.

Kenific, CM, Stehbens, SJ, Goldsmith, J, Leidal, AM, Faure, N, Ye, J, Wittmann, T, and Debnath, J. (2016). NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. J. Cell Biol., 212, 577–590.

Kenific, CM, Wittmann, T, and Debnath, J. (2016). Autophagy in adhesion and migration. J. Cell Sci., 129, 3685–3693.

Kim, J, Kundu, M, Viollet, B, and Guan, K. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol., 13, 132–141.

Kimura, S, Noda, T, and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. Cell Struct. Funct., 33, 109–122.

Kirisako, T, Ichimura, Y, Okada, H, Kabeya, Y, Mizushima, N, Yoshimori, T, Ohsumi, M, Takao, T, Noda, T, and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J. Cell Biol., 151, 263–275.

Kirkin, V, Lamark, T, Sou, YS, Bjørkøy, G, Nunn, JL, Bruun, JA, Shvets, E, McEwan, DG, Clausen, TH, Wild, P, Bilusic, I, Theurillat, JP, Øvervatn, A, Ishii, T, Elazar, Z, Komatsu, M, Dikic, I, and Johansen, T. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. Mol. Cell, 33, 505–516.

Knævelsrud, H, Søreng, K, Raiborg, C, Håberg, K, Rasmuson, F, Brech, A, Liestøl, K, Rusten, TE, Stenmark, H, Neufeld, TP, Carlsson, SR, and Simonsen, A. (2013). Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. J. Cell Biol., 202, 331–349.

Koga, H, Martinez-Vicente, M, Macian, F, Verkhusha, VV, and Cuervo, AM. (2011). A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. Nat. Commun., 12, 1–19.

Komatsu, M, Waguri, S, Chiba, T, Murata, S, Iwata, J, Tanida, I, Ueno, T, Koike, M, Uchiyama, Y, Kominami, E, and Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature, 441, 880–884.

Komatsu, M, Waguri, S, Ueno, T, Iwata, J, Murata, S, Tanida, I, Ezaki, J, Mizushima, N, Ohsumi, Y, Uchiyama, Y, Kominami, E, Tanaka, K, and Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. J. Cell Biol., 169, 425–434.

Kondo, Y, Kanzawa, T, Sawaya, R, and Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat. Rev. Cancer, 5, 726–734.

Kouno, T, Mizuguchi, M, Tanidal, I, Uenol, T, Kanematsu, T, Mori, Y, Shinoda, H, Hirata, M, Kominami, E, and Kawano, K. (2005). Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. J. Biol. Chem., 280, 24610–24617.

Krueger, KM, Daaka, Y, Pitcher, JA, and Lefkowitz, RJ. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. J. Biol. Chem., 272, 5–8.

Krupnick, JG, and Benovic, JL. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 38, 289–319.

Kuma, A, Hatano, M, Matsui, M, Yamamoto, A, Nakaya, H, Yoshimori, T, Ohsumi, Y, Tokuhisa, T, and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal

starvation period. Nature, 432, 1032–1036.

Kundu, M, Lindsten, T, Yang, CY, Wu, J, Zhao, F, Zhang, J, Selak, MA, Ney, PA, and Thompson, CB. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. Blood, 112, 1493–1502.

Kural, C, Akatay, AA, Gaudin, R, Chen, B-C, Legant, WR, Betzig, E, and Kirchhausen, T. (2015). Asymmetric formation of coated pits on dorsal and ventral surfaces at the leading edges of motile cells and on protrusions of immobile cells. Mol. Biol. Cell, 26, 2044–2053.

-L-

Lai, F, Szczodrak, M, Oelkers, JM, Ladwein, M, Acconcia, F, Benesch, S, Auinger, S, Faix, J, Small, JV, Polo, S, Stradal, T, and Rottner, K. (2009). Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. Mol. Biol. Cell, 20, 3209–3223.

Lal, S, La Du, J, Tanguay, RL, and Greenwood, JA. (2012). Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. J. Neurosci. Res., 90, 769–781.

Lamb, CA, Yoshimori, T, and Tooze, SA. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 14, 759–774.

Lambrechts, A, Van Troys, M, and Ampe, C. (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. Int. J. Biochem. Cell Biol., 36, 1890–1909.

Lauffenburger, D, and Horwitz, AF. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell, 84, 359–369.

Lawson, C, Lim, ST, Uryu, S, Chen, XL, Calderwood, DA, and Schlaepfer, DD. (2012). FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. J. Cell Biol., 196, 223–232.

Lecointre, C, Desrues, L, Joubert, JE, Perzo, N, Guichet, P-O, Le Joncour, V, Brulé, C, Chabbert, M, Leduc, R, Prézeau, L, Laquerrière, A, Proust, F, Gandolfo, P, Morin, F, and Castel, H. (2015). Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. Oncogene, 34, 5080–5094.

Lee, S-J, Kim, H-P, Jin, Y, Choi, AMK, and Ryter, SW. (2011). Beclin 1 deficiency is associated with increased hypoxia-induced angiogenesis. Autophagy, 7, 829–839.

Lefkowitz, RJ. (2011). Transduction of receptor signals. Science, 512, 512–518.

Leloup, L, and Wells, A. (2011). Calpains as potential anti-cancer targets. Expert Opin. Ther. Targets, 15, 309–323.

Li, H, Yang, L, Fu, H, Yan, J, Wang, Y, Guo, H, Hao, X, Xu, X, Jin, T, and Zhang, N. (2013). Association between Gαi2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. Nat. Commun., 4, 1706–1717.

Li, R, Mitra, N, Gratkowski, H, Vilaire, G, Litvinov, R, Nagasami, C, Weisel, JW, Lear, JD, Degrado, WF, and Bennett, JS. (2003). Activation of integrin alphaIIbbeta3 by

modulation of transmembrane helix associations. Science, 300, 795–798.

Li, WW, Li, J, and Bao, JK. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. Cell. Mol. Life Sci., 69, 1125–1136.

Li, Y, Wang, Y, Kim, E, Beemiller, P, Wang, C-Y, Swanson, J, You, M, and Guan, K-L. (2007). Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. J. Biol. Chem., 282, 35803–35813.

Li, Z, Hannigan, M, Mo, Z, Liu, B, Lu, W, Wu, Y, Smrcka, AV, Wu, G, Li, L, Liu, M, Huang, C-K, and Wu, D. (2003). Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. Cell, 114, 215–227.

Liang, C, Feng, P, Ku, B, Dotan, I, Canaani, D, Oh, B-H, and Jung, JU. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. Nat. Cell Biol., 8, 688–699.

Liang, C, Lee, J, Inn, K, Gack, MU, Li, Q, Roberts, EA, Vergne, I, Deretic, V, Feng, P, Akazawa, C, and Jung, JU. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. Nat. Cell Biol., 10, 776–787.

Liang, XH, 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.

Lidke, DS, Lidke, KA, Rieger, B, Jovin, TM, and Arndt-Jovin, DJ. (2005). Reaching out for signals: Filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. J. Cell Biol., 170, 619–626.

Liliental, J, Moon, SY, Lesche, R, Mamillapalli, R, Li, D, Zheng, Y, Sun, H, and Wu, H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. Curr. Biol., 10, 401–404.

Lin, M-E, Herr, DR, and Chun, J. (2010). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 91, 130–138.

Lobert, VH, Brech, A, Pedersen, NM, Wesche, J, Oppelt, A, Malerød, L, and Stenmark Harald, H. (2010). Ubiquitination of α5β1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. Dev. Cell, 19, 148–159.

Lock, R, Roy, S, Kenific, CM, Su, JS, Salas, E, Ronen, SM, and Debnath, J. (2011). Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. Mol. Biol. Cell, 22, 165–178.

Longatti, A, Lamb, CA, Razi, M, Yoshimura, SI, Barr, FA, and Tooze, SA. (2012). TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. J. Cell Biol., 197, 659–675.

Lorin, S, Codogno, P, and Djavaheri-Mergny, M. (2008). L'autophagie : un nouveau concept en cancérologie. Bull. Cancer, 95, 43–50.

Lorin, S, Tol, MJ, Bauvy, C, Strijland, A, Poüs, C, Verhoeven, AJ, Codogno, P, and Meijer, AJ. (2013). Glutamate dehydrogenase contributes to leucine sensing in the regulation of

autophagy. Autophagy, 9, 850–860.

Lum, JJ, Bauer, DE, Kong, M, Harris, MH, Li, C, Lindsten, T, and Thompson, CB. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell, 120, 237–248.

Luttrell, LM, Roudabush, FL, Choy, EW, Miller, WE, Field, ME, Pierce, KL, and Lefkowitz, RJ. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 2449–2454.

-M-

Machacek, M, Hodgson, L, Welch, C, Elliott, H, Nalbant, P, Abell, A, Johnson, GL, and Hahn, KM. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. Nature, 461, 99–103.

Machesky, LM, and Lia, A. (2010). Fascin: invasive filopodia promoting metastasis. Commun. Integr. Biol., 3, 263–270.

Macintosh, RL, Timpson, P, Thorburn, J, Anderson, KI, Thorburn, A, and Ryan, KM. (2012). Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. Cell Cycle, 11, 2022–2029.

Maghazachi, AA. (1997). Role of the heterotrimeric G proteins in stromal-derived factor-1alpha-induced natural killer cell chemotaxis and calcium mobilization. Biochem. Biophys. Res. Commun., 236, 270–274.

Maguire, JJ, and Davenport, AP. (2002). Is urotensin-II the new endothelin? Br. J. Pharmacol., 137, 579–588.

Mahalingam, D, Mita, M, Sarantopoulos, J, Wood, L, Amaravadi, RK, Davis, LE, Mita, AC, Curiel, TJ, Espitia, CM, Nawrocki, ST, Giles, FJ, and Carew, JS. (2014). Combined autophagy and HDAC inhibition: a phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors. Autophagy, 10, 1403–1414.

Maiuri, MC, Le Toumelin, G, Criollo, A, Rain, J-C, Gautier, F, Juin, P, Tasdemir, E, Pierron, G, Troulinaki, K, Tavernarakis, N, Hickman, JA, Geneste, O, and Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. EMBO J., 26, 2527–2539.

Malek, M, Aghili, R, Emami, Z, and Khamseh, M. (2013). Risk of cancer in diabetes: the effect of metformin. ISRN Endocrinol., 1, 1–9.

Margadant, C, Monsuur, HN, Norman, JC, and Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. Curr. Opin. Cell Biol., 23, 607–614.

Margadant, F, Chew, LL, Hu, X, Yu, H, Bate, N, Zhang, X, and Sheetz, M. (2011). Mechanotransduction in vivo by repeated talin stretch-relaxation events depends upon vinculin. PLoS Biol., 9, 607–614.

Mari, M, Griffith, J, Rieter, E, Krishnappa, L, Klionsky, DJ, and Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome

biogenesis. J. Cell Biol., 190, 1005–1022.

Maria, A, Dice, JF, Cuervo, AM, and Dice, JF. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science, 273, 501–503.

Marzella, L, Ahlberg, J, and Glaumann, H. (1980). In vitro uptake of particles by lysosomes. Exp. Cell Res., 129, 460–466.

Masiero, E, Agatea, L, Mammucari, C, Blaauw, B, Loro, E, Komatsu, M, Metzger, D, Reggiani, C, Schiaffino, S, and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. Cell Metab., 10, 507–515.

Mathew, R, Kongara, S, Beaudoin, B, Karp, CM, Bray, K, Degenhardt, K, Chen, G, Jin, S, and White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. Genes Dev., 21, 1367–1381.

Matsunaga, K, Saitoh, T, Tabata, K, Omori, H, Satoh, T, Kurotori, N, Maejima, I, Shirahama-Noda, K, Ichimura, T, Isobe, T, Akira, S, Noda, T, and Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. Nat. Cell Biol., 11, 385–396.

Matsunami, H, Montmayeur, JP, and Buck, LB. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. Nature, 404, 601–604.

Matsusaka, S, and Wakabayashi, I. (2006). Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol., 373, 381–386.

Matsuura, A, Tsukada, M, Wada, Y, and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae. Gene, 192, 245–250.

McAfee, Q, Zhang, Z, Samanta, A, Levi, SM, Ma, X, Piao, S, Lynch, JP, Uehara, T, Sepulveda, AR, Davis, LE, Winkler, JD, and Amaravadi, RK. (2012). Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109, 8253–8258.

McKnight, NC, and Zhenyu, Y. (2014). Beclin 1, an essential component and master regulator of PI3K- III in health and disease. Curr Pathobiol. Rep., 1, 231–238.

Mellor, H. (2010). The role of formins in filopodia formation. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res., 1803, 191–200.

Merlot, S, and Firtel, RA. (2003). Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. J. Cell Sci., 116, 3471–3478.

Merz, EA, Brinster, RL, Brunner, S, and Chen, HY. (1981). Protein degradation during preimplantation development of the mouse. J. Reprod. Fertil., 61, 415–418.

Mijaljica, D, Prescott, M, and Devenish, RJ. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. Autophagy, 7, 673–682.

Miyamoto, S, Teramoto, H, Coso, OA, Gutkind, JS, Burbelo, PD, Akiyama, SK, and Yamada, KM. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. J. Cell Biol., 131, 791–805.

Mizushima, N, Kuma, A, Kobayashi, Y, Yamamoto, A, Matsubae, M, Takao, T, Natsume, T, Ohsumi, Y, and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J. Cell Sci., 116, 1679–1688.

Mizushima, N, Noda, T, and Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. EMBO J., 18, 3888–3896.

Mizushima, N, Noda, T, Yoshimori, T, Tanaka, Y, Ishii, T, George, MD, Klionsky, DJ, Ohsumi, M, and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. Nature, 395, 395–398.

Mizushima, N, Sugita, H, Yoshimori, T, and Ohsumi, Y. (1998). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. J. Biol. Chem., 273, 33889–33892.

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. J. Cell Biol., 152, 657–668.

Mizushima, N, Yoshimorim, T, and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. Cell, 140, 313–326.

Moreau, K, Ravikumar, B, Puri, C, and Rubinsztein, DC. (2012). Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. J. Cell Biol., 196, 483–496.

Moreau, K, Ravikumar, B, Renna, M, Puri, C, and Rubinsztein, DC. (2011). Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. Cell, 146, 303–317.

Morozova, K, Sidhar, S, Zolla, V, Clement, CC, Scharf, B, Verzani, Z, Diaz, A, Larocca, JN, Hajjar, KA, Cuervo, AM, and Santambrogio, L. (2015). Annexin A2 promotes phagophore assembly by enhancing Atg16L+ vesicle biogenesis and homotypic fusion. Nat. Commun., 6, 5856–5868.

Mortensen, M, Ferguson, DJP, Edelmann, M, Kessler, B, Morten, KJ, Komatsu, M, and Simon, AK. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 832–837.

Mortimore, GE, and Schworer, CM. (1977). Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. Nature, 270, 174–176.

Mouneimne, G, Soon, L, DesMarais, V, Sidani, M, Song, X, Yip, SC, Ghosh, M, Eddy, R, Backer, JM, and Condeelis, J. (2004). Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. J. Cell Biol., 166, 697–708.

Mousavi, SA, Malerød, L, Berg, T, and Kjeken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. Biochem. J., 377, 1–16.

Murphy, PM, Baggiolini, M, Charo, IF, Hébert, CA, Horuk, R, Matsushima, K, Miller, LH, Oppenheim, JJ, and Power, CA. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol. Rev., 52, 145–176.

-N-

Nagano, M, Hoshino, D, Koshikawa, N, Akizawa, T, and Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. Int. J. Cell Biol., 2012, 1–11.

Nagano, M, Hoshino, D, Sakamoto, T, Kawasaki, N, Koshikawa, N, and Seiki, M. (2010). ZF21 protein regulates cell adhesion and motility. J. Biol. Chem., 285, 21013–21022.

Nakatogawa, H, Ichimura, Y, and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. Cell, 130, 165–178.

Nakatogawa, H, Suzuki, K, Kamada, Y, and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Mol. Cell Biol., 10, 458–467.

Nishimura, T, and Kaibuchi, K. (2007). Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with PKC and PAR-3. Dev. Cell, 13, 15–28.

Nobes, CD, and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell, 81, 53–62.

Norman, JM, Cohen, GM, and Bampton, ETW. (2010). The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. Autophagy, 6, 1042–1056.

Novikoff, AB. (1959). The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 136–138.

Novikoff, AB, and Essner, E. (1962). Cytolysomes and mitochondrial degeneration. J. Cell Biol., 15, 140–146.

Novikoff, AB, Essner, E, Quintana, N. (1964). Golgi apparatus and lysosomes. Fed. Proc., 23, 1010–22

Nuzzi, PA, Senetar, MA, and Huttenlocher, A. (2007). Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. Mol. Biol. Cell, 18, 795–805.

-O-

Orimo, A, Gupta, PB, Sgroi, DC, Arenzana-Seisdedos, F, Delaunay, T, Naeem, R, Carey, VJ, Richardson, AL, and Weinberg, RA. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell, 121, 335–348.

Orsi, A, Razi, M, Dooley, HC, Robinson, D, Weston, AE, Collinson, LM, and Tooze, SA. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. Mol. Biol. Cell, 23, 1860–1873.

-P-

Palecek, SP, Huttenlocher, A, Horwitz, AF, and Lauffenburger, DA. (1998). Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. J. Cell Sci., 111, 929–940.

Panaretou, C, Domin, J, Cockcroft, S, and Waterfield, M. (1997). Characterization of p150 an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. J. Biol. Chem., 272, 2477–2485.

Pankiv, S, Clausen, TH, Lamark, T, Brech, A, Bruun, J-A, Outzen, H, Øvervatn, A, Bjørkøy, G, and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J. Biol. Chem., 282, 24131–24145.

Parent, CA, and Devreotes, PN. (1999). A cell's sense of direction. Science, 284, 765–770.

Parsons, JT, Horwitz, AR, and Schwartz, MA. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 11, 633–643.

Pasquier, B, El-Ahmad, Y, Filoche-Romme, B, Dureuil, C, Fassy, F, Abecassis, P, Mathieu, M, Bertrand, T, Benard, T, El Batti, S, Letallec, J, Brollo, M, Delbarre, L, Labrosse, J, Cle, J, Durand, F, Combet, R, Perraut, P, Leroy, V, Lefranc, D, Michot, N, Caron, A, Castell, C, Schio, L, and Mccort, G. (2015). Discovery of (2S) ‐ 8-[(3R) ‐ 3-Methylmorpholin-4-yl]-1-(3-methyl-2-oxobutyl)-2-(trifluoromethyl)-3,4-dihydro ‐ 2Hpyrimido[1,2‐a]pyrimidin-6-one: A novel potent and selective inhibitor of Vps34 for the treatment of solid tumors. J. Med. Chem., 58, 376–400.

Pattingre, S, and Levine, B. (2006). Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? Cancer Res., 66, 2885–2888.

Paul, NR, Jacquemet, G, and Caswell, PT. (2015). Endocytic trafficking of integrins in cell migration. Curr. Biol., 25, 1092–1105.

Petherick, KJ, Conway, OJL, Mpamhanga, C, Osborne, SA, Kamal, A, Saxty, B, and Ganley, IG. (2015). Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. J. Biol. Chem., 290, 11376–11383.

Pezet, M, Jacob, M-P, Escoubet, B, Gheduzzi, D, Tillet, E, Perret, P, Huber, P, Quaglino, D, Vranckx, R, Li, DY, Starcher, B, Boyle, WA, Mecham, RP, and Faury, G. (2013). Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. Rejuvenation Res., 11, 97–112.

Pfeifer, U. (1977). Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles. Acta. Biol. Med. Ger., 36, 1691–4

Popovic, D, and Dikic, I. (2014). TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. EMBO Rep., 15, 392–401.

Porrello, ER, D'Amore, A, Curl, CL, Allen, AM, Harrap, SB, Thomas, WG, and Delbridge, LMD. (2009). Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. Hypertension, 53, 1032–1040.

Proikas-Cezanne, T, Takacs, Z, Donnes, P, and Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. J. Cell Sci, 128, 207–217.

Puri, C, Renna, M, Bento, CF, Moreau, K, and Rubinsztein, DC. (2013). Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. Cell, 154, 1285–1299.

-Q-

Qiang, L, Zhao, B, Ming, M, Wang, N, He, T-C, Hwang, S, Thorburn, A, and He, Y-Y. (2014). Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111, 9241–9246.

-R-

Raman, D, Baugher, PJ, Thu, YM, and Richmond, A. (2012). Role of chemokines in tumor growth. Cancer Lett., 100, 130–134.

Rapaport, D, Lugassy, Y, Sprecher, E, and Horowitz, M. (2010). Loss of SNAP29 impairs endocytic recycling and cell motility. PLoS One, 5, 9759–9773.

Rappoport, JZ, and Simon, SM. (2003). Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration. J. Cell Sci., 116, 847–855.

Ravikumar, B, Moreau, K, Jahreiss, L, Puri, C, and Rubinsztein, DC. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. Nat. Cell Biol., 12, 747–757.

Razi, M, Chan, EYW, and Tooze, SA. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. J. Cell Biol., 185, 305–321.

Rebecca, VW, and Amaravadi, RK. (2016). Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. Oncogene, 21, 193–201.

Renna, M, Bento, CF, Fleming, A, Menzies, FM, Siddiqi, FH, Ravikumar, B, Puri, C, Garcia-Arencibia, M, Sadiq, O, Corrochano, S, Carter, S, Brown, SDM, Acevedo-Arozena, A, and Rubinsztein, DC. (2013). IGF-1 receptor antagonism inhibits autophagy. Hum. Mol. Genet., 22, 4528–4544.

Ridley, AJ. (2011). Life at the leading edge. Cell, 145, 1012–1022.

Ridley, AJ, Schwartz, MA, Burridge, K, Firtel, RA, Ginsberg, MH, Borisy, GG, Parsons, JT, and Horwitz, AR. (2003). Cell migration : integrating signals from front to back. Science, 302, 1704–1710.

Riggs, KA., Hasan, N, Humphrey, D, Raleigh, C, Nevitt, C, Corbin, D, and Hu, C. (2012). Regulation of integrin endocytic recycling and chemotactic cell migration by syntaxin 6 and VAMP3 interaction. J. Cell Sci., 125, 3827–3839.

Rio, A, Perez-Jimenez, R, Liu, R, Roca-Cusachs, P, Fernandez, JM, and Sheetz, MP. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. Science, 323, 638–641.

Romanov, J, Walczak, M, Ibiricu, I, Schüchner, S, Ogris, E, Kraft, C, and Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. EMBO J., 31, 4304–4317.

Ronan, B, Flamand, O, Vescovi, L, Dureuil, C, Durand, L, Fassy, F, Bachelot, M-F, Lamberton, A, Mathieu, M, Bertrand, T, Marquette, J-P, El-Ahmad, Y, Filoche-Romme, B, Schio, L, Garcia-Echeverria, C, Goulaouic, H, and Pasquier, B. (2014). A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. Nat. Chem.

Biol., 10, 1013–109.

Rottner, K, Hall, A, and Small, J V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. Curr. Biol., 9, 640–648.

Roussos, ET, Condeelis, JS, and Patsialou, A. (2011). Chemotaxis in cancer. Nat. Rev. Cancer, 11, 573–587.

Royle, SJ, Bobanović, LK, and Murrell-Lagnado, RD. (2002). Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. J. Biol. Chem., 277, 35378–35385.

Rubin, JB. (2009). Chemokine signaling in cancer: One hump or two? Semin. Cancer Biol., 19, 116–122.

Ruoslahti, E, and Pierschbacher, MD. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science, 238, 491–497.

Russell, RC, Tian, Y, Yuan, H, Park, HW, Chang, Y, Kim, H, Neufeld, TP, Dillin, A, and Guan, K. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. Nat. Cell Biol., 15, 741–750.

-S-

Saint, S, Bâtiment, E, and Fliche, A. (2011). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. Trends Mol. Med., 16, 133–144.

Sakai, M, Araki, N, and Ogawa, K. (1989). Lysosomal movements during heterophagy and autophagy: with special reference to nematolysosome and wrapping lysosome. J. Electron Microsc. Tech., 12, 101–131.

Sancak, Y, Bar-Peled, L, Zoncu, R, Markhard, AL, Nada, S, and Sabatini, DM. (2011). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids Yasemin. Cell, 141, 290–303.

Sancak, Y, Peterson, TR, Shaul, YD, Lindquist, RA, Thoreen, CC, Bar-Peled, L, and Sabatini, DM. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science, 320, 1496–1501.

Sandoval, H, Thiagarajan, P, Dasgupta, SK, Schumacher, A, Prchal, T, Chen, M, and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. Nature, 454, 232–235.

Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. Biochem. Soc. Trans., 41, 1103–1130.

Schaefer, L, and Schaefer, RM. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. Cell Tissue Res., 339, 237–246.

Schafer, DA, Jennings, PB, and Cooper, JA. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. J. Cell Biol., 135, 169–179.

Schirenbeck, A, Bretschneider, T, Arasada, R, Schleicher, M, and Faix, J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. Nat. Cell Biol., 7, 619–625.

Schmoranzer, J, Kreitzer, G, and Simon, S. (2003). Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. J. Cell Sci., 116, 4513–4519.

Schwartz, MA, Schaller, MD, and Ginsberg, MH. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 11, 549–599.

Schwarze, PE, and Seglen, PO. (1985). Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. Exp. Cell Res., 157, 15–28.

Schweers, RL, Zhang, J, Randall, MS, Loyd, MR, Li, W, Dorsey, FC, Kundu, M, Opferman, JT, Cleveland, JL, Miller, JL, and Ney, PA. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104, 19500–19505.

Segain, J-P, Rolli-Derkinderen, M, Gervois, N, Raingeard de la Blétière, D, Loirand, G, and Pacaud, P. (2007). Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. J. Immunol., 179, 901–909.

Seglen, PO, Gordon, PB, and Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta, 630, 103–118.

Sehgal, A, Keener, C, Boynton, AL, Warrick, J, and Murphy, GP. (1998). CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. J. Surg. Oncol., 69, 99–104.

Serrano, K, and Devine, DV. (2004). Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. Cell Motil. Cytoskeleton, 58, 242–252.

Servant, G, Weiner, OD, Neptune, ER, Sedat, JW, and Bourne, HR. (1999). Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. Mol. Biol. Cell, 10, 1163–1178.

Shao, H, Chou, J, Baty, CJ, Burke, NA, Watkins, SC, Stolz, DB, and Wells, A. (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. Mol. Cell. Biol., 26, 5481–5496.

Sharifi, MN, Mowers, EE, Drake, LE, Collier, C, Chen, H, Zamora, M, Mui, S, and Macleod, KF. (2016). Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3. Cell Rep., 15, 1660–1672.

Shenouda, A, Douglas, SA, Ohlstein, EH, and Giaid, A. (2002). Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. J. Histochem. Cytochem., 50, 885–889.

Shibata, M, Yoshimura, K, Tamura, H, Ueno, T, Nishimura, T, Inoue, T, Sasaki, M, Koike, M, Arai, H, Kominami, E, and Uchiyama, Y. (2010). LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 393, 274–279.

Shiraha, H, Glading, A, Chou, J, Wells, A, and Jia, Z. (2002). Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain, 22, 2716–2727.

Singh, R, Xiang, Y, Wang, Y, Baikati, K, Cuervo, AM, Luu, YK, Tang, Y, Pessin, JE, Schwartz, GJ, and Czaja, MJ. (2009). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. J. Clin. Invest., 119, 3329–3339.

Skalski, M, Yi, Q, Kean, MJ, Myers, DW, Williams, KC, Burtnik, A, and Coppolino, MG. (2010). Lamellipodium extension and membrane ruffling require different SNARE-mediated trafficking pathways. BMC Cell Biol., 11, 62–78.

Srinivasan, S, Wang, F, Glavas, S, Ott, A, Hofmann, F, Aktories, K, Kalman, D, and Bourne, HR. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. J. Cell Biol., 160, 375–385.

Stephens, L, Smrcka, A, Cooke, FT, Jackson, TR, Sternweis, PC, and Hawkins, PT. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. Cell, 77, 83–93.

Stitzel, ML, and Seydoux, G. (2007). Regulation of the oocyte-to-zygote transition. Science, 316, 407–408.

Stokoe, D, Stephens, LR, Copeland, T, Gaffney, PRJ, Reese, CB, Painter, GF, Holmes, AB, McCormick, F, and Hawkins, PT. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate in the activation of protein kinase B. Science, 277, 567–570.

Storr, SJ, Carragher, NO, Frame, MC, Parr, T, and Martin, SG. (2011). The calpain system and cancer. Nat. Rev. Cancer, 11, 364–374.

Su, Y, Cui, Z, Li, Z, and Block, ER. (2006). Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. FASEB J., 20, 1443–1451.

Sui, X, Chen, R, Wang, Z, Huang, Z, Kong, N, Zhang, M, Han, W, Lou, F, Yang, J, Zhang, Q, Wang, X, He, C, and Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. Cell Death Dis., 4, 1–12.

Sun, Y, Cheng, Z, Ma, L, and Pei, G. (2002). β-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. J. Biol. Chem., 277, 49212–49219.

-T-

Tadokoro, S, Shattil, SJ, Eto, K, Tai, V, Liddington, RC, de Pereda, JM, Ginsberg, MH, and Calderwood, DA. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. Science, 302, 103–106.

Takai, Y, Sasaki, T, and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. Physiol. Rev., 81,

153–208.

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., 5, 795–800.

Takano-Ohmuro, H, Mukaida, M, Kominami, E, and Morioka, K. (2000). Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. Eur. J. Cell Biol., 79, 759–764.

Tamura, M, Gu, J, Matsumoto, K, Aota, S, Parsons, R, and Yamada, KM. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. Science, 280, 1614–1617.

Teicher, BA, and Fricker, SP. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Clin. Cancer Res., 16, 2927–2931.

Tian, Y, Chang, JC, Fan, EY, Flajolet, M, and Greengard, P. (2013). Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. Proc. Natl. Acad. Sci., 110, 17071–17076.

Tooze, J, and Davies, HG. (1965). Cytolysomes in Amphibian Erythrocytes. J. Cell Biol., 24, 146–150.

Tseng, HY, Thorausch, N, Ziegler, T, Meves, A, Fässler, R, and Böttcher, RT. (2014). Sorting nexin 31 binds multiple β integrin cytoplasmic domains and regulates β1 integrin surface levels and stability. J. Mol. Biol., 426, 3180–3194.

Tsukamoto, S, Kuma, A, Murakami, M, Kishi, C, Yamamoto, A, and Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. Science, 321, 117–120.

Tuloup-Minguez, V, Hamaï, A, Greffard, A, Nicolas, V, Codogno, P, and Botti, J. (2013). Autophagy modulates cell migration and β1 integrin membrane recycling. Cell Cycle, 12, 3317–3328.

Turner, CE. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. Nat. Cell Biol., 2, 231–236.

-V-

Van Der Vaart, A, Mari, M, and Reggiori, F. (2008). A picky eater: Exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies. Traffic, 9, 281–289.

Van Rheenen, J, Condeelis, J, and Glogauer, M. (2009). A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. J. Cell Sci., 122, 305–311.

Veale, KJ, Offenhäuser, C, Whittaker, SP, Estrella, RP, and Murray, RZ. (2010). Recycling endosome membrane incorporation into the leading edge regulates lamellipodia formation and macrophage migration. Traffic, 11, 1370–1379.

Veltman, DM, and Insall, RH. (2010). WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. Mol. Biol. Cell, 21, 4325–4337.

Vicente-Manzanares, M, Webb, DJ, and Horwitz, AR. (2005). Cell migration at a glance. J. Cell Sci., 118, 4917–4919.

Vogl, DT, Stadtmauer, EA, Tan, KS, Heitjan, DF, Davis, LE, Pontiggia, L, Rangwala, R, Piao, S, Chang, YC, Scott, EC, Paul, TM, Nichols, CW, Porter, DL, Kaplan, J, Mallon, G, Bradner, JE, and Amaravadi, RK. (2014). Combined autophagy and proteasome inhibition a phase 1 trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma. Autophagy, 10, 1380–1390.

-W-

Wauson, EM, Dbouk, HA, Ghosh, AB, and Cobb, MH. (2014). G protein-coupled receptors and the regulation of autophagy. Trends Endocrinol. Metab., 25, 274–282.

Wauson, EM, Zaganjor, E, Lee, AY, Guerra, ML, Ghosh, AB, Bookout, AL, Chambers, CP, Jivan, A, McGlynn, K, Hutchison, MR, Deberardinis, RJ, and Cobb, MH. (2012). The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy. Mol. Cell, 47, 851–862.

Webb, DJ, Donais, K, Whitmore, LA, Thomas, SM, Turner, CE, Parsons, JT, and Horwitz, AF. (2004). FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. Nat. Cell Biol., 6, 154–161.

Wei, C, Wang, X, Chen, M, Ouyang, K, Song, L-S, and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. Nature, 457, 901–905.

Wei, Y, Zou, Z, Becker, N, Anderson, M, Sumpter Jr, R, Xiao, G, Kinch, L, Koduru, P, Christudass, CS, Robert, W, Grishin, NV, Peyton, M, Minna, J, Bhagat, G, and Levine, B. (2013). EGFR-mediated phosphorylation of Beclin 1 in autophagy suppression, tumor progression and tumor chemoresistance. Cell, 154, 1269–1284.

Weiner, OD. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. Curr. Opin. Cell Biol., 14, 196–202.

Welch, MD, and Mullins, RD. (2002). Cellular control of actin nucleation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 18, 247–288.

Winograd-Katz, SE, Fässler, R, Geiger, B, and Legate, KR. (2014). The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 15, 273–288.

Wolfenson, H, Henis, YI, Geiger, B, and Bershadsky, AD. (2009). The heel and toe of the cell's foot: A multifaceted approach for understanding the structure and dynamics of focal adhesions. Cell Motil. Cytoskeleton, 66, 1017–1029.

Wong, PM, Puente, C, Ganley, IG, and Jiang, X. (2013). The ULK1 complex sensing nutrient signals for autophagy activation. Autophagy, 9, 124–137.

-X-

Xi, XP, Graf, K, Goetze, S, Fleck, E, Hsueh, WA, and Law, RE. (1999). Central role of the MAPK pathway in Ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19, 73–82.

Xia, H-G, Zhang, L, Chen, G, Zhang, T, Liu, J, Jin, M, Ma, X, Ma, D, and Yuan, J. (2010). Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. Autophagy, 6, 61–66.

Xiao, Z, Zhang, N, Murphy, DB, and Devreotes, PN. (1997). Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. J. Cell Biol., 139, 365–374.

Xing, F, Saidou, J, and Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. Front. Biosci., 15, 166–179.

Xu, S, Jiang, H, Wu, B, Yang, J, and Chen, S. (2009). Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. Tohoku J. Exp. Med., 219, 283–288.

-Y-

Yadav, A, Vallabu, S, Arora, S, Tandon, P, Slahan, D, Teichberg, S, and Singhal, PC. (2010). ANG II promotes autophagy in podocytes. Am. J. Cell Physiol., 299, 488–496.

Yan, B, Calderwood, DA, Yaspan, B, and Ginsberg, MH. (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta3 integrin cytoplasmic domain. J. Biol. Chem., 276, 28164–28170.

Yang, J, Mani, SA, Donaher, JL, Ramaswamy, S, Itzykson, RA, Come, C, Savagner, P, Gitelman, I, Richardson, A, and Weinberg, RA. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell, 117, 927–939.

Yoshida, T, Tsujioka, M, Honda, S, and Tanaka, M. (2016). Autophagy suppresses cell migration by degrading GEF-H1, a RhoA GEF. Oncotarget, 7, 1–10.

Yoshigi, M, Hoffman, LM, Jensen, CC, Yost, HJ, and Beckerle, MC. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. J. Cell Biol., 171, 209–215.

Young, ARJ, Chan, EYW, Hu, XW, Köchl, R, Crawshaw, SG, High, S, Hailey, DW, Lippincott-Schwartz, J, and Tooze, SA. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. J. Cell Sci., 119, 3888–3900.

Yousefi, S, Perozzo, R, Schmid, I, Ziemiecki, A, Schaffner, T, Scapozza, L, Brunner, T, and Simon, H-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat. Cell Biol., 8, 1124–1132.

Yu, K-Y, Wang, Y-P, Wang, L-H, Jian, Y, Zhao, X-D, Chen, J-W, Murao, K, Zhu, W, Dong, L, Wang, G-Q, and Zhang, G-X. (2014). Mitochondrial KATP channel involvement in angiotensin II-induced autophagy in vascular smooth muscle cells. Basic Res. Cardiol., 109, 416–431.

-Z-

Zaffagnini, G, and Martens, S. (2016). Mechanisms of selective autophagy. J. Mol. Biol., 428, 1714–1724.

Zagzag, D, Esencay, M, Mendez, O, Yee, H, Smirnova, I, Huang, Y, Chiriboga, L, Lukyanov, E, Liu, M, and Newcomb, EW. (2008). Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1α/CXCR4 expression in glioblastomas. Am. J. Pathol., 173, 545–560.

Zaidel-Bar, R, Cohen, M, Addadi, L, and Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. Biochem. Soc. Trans., 32, 416–420.

Zaidel-Bar, R, and Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. J. Cell Sci., 123, 1385–1388.

Zaidel-Bar, R, Itzkovitz, S, Ma'ayan, A, Iyengar, R, and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. Nat. Cell Biol., 9, 858–867.

Zamir, E, Katz, BZ, Aota, S, Yamada, KM, Geiger, B, and Kam, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. J. Cell Sci., 112, 1655–1669.

Zhan, Z, Xie, X, Cao, H, Zhou, X, Zhang, XD, Fan, H, and Liu, Z. (2014). Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination. Autophagy, 10, 257–268.

Zhang, W, Lane, RD, and Mellgren, RL. (1996). The major calpain isozymes are long-lived proteins. J. Biol. Chem., 271, 18825–18830.

Zhang, Y-G, Li, J, Li, Y-G, and Wei, R-H. (2008). Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. J. Hypertens., 26, 1119–1126.

Zhao, J, Brault, JJ, Schild, A, Cao, P, Sandri, M, Schiaffino, S, Lecker, SH, and Goldberg, AL. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. Cell Metab., 6, 472–483.

Zoncu, R, Bar-Peled, L, Alejo, E, Wang, S, Yasemin, S, and Sabatini, DM. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the Vacuolar H+ -ATPase. Science, 334, 678–683.

Publication annexe

A key evolutionary proline position - P2.58 - in G protein-coupled receptors controls adhesion and cell polarization during chemotaxis

Jane-Eileen Joubert, Laurence Desrues, Pierre-Michaël Coly, Alexandre Mutel, Céline Lecointre, Nicolas Perzo, Laure Guilhaudis, Isabelle Milazzo, Pierrick Gandolfo, Fabrice Morin, Laurent Prézeau, Marie Chabbert and Hélène Castel

(en préparation)

A key evolutionary proline position - P2.58 - in G protein-coupled receptors controls adhesion and cell polarization during chemotaxis

Jane-Eileen Joubert[1,2], Laurence Desrues[1,2], Pierre-Michael Coly[1,2], Alexandre Mutel[1,2], Céline Lecointre[1,2], Nicolas Perzo[1], Laure Guilhaudis[2,3], Isabelle Milazzo[2,3], Pierrick Gandolfo[1,2], Fabrice Morin[1,2], Laurent Prézeau[4], Marie Chabbert[5] and Hélène Castel[1,2,*]

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, 76000 Rouen, France
[2]Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France
[3]Normandie Univ, UNIROUEN, CNRS,COBRA, 76000 Rouen, France
[4]IGF, Institut of Functional Genomic, CNRS UMR 5203, Inserm U661, University of Montpellier 1 and 2, Montpellier, France.
[5]UMR CNRS 6214, Inserm 1083, Faculté de Médecine 3, Angers, France.

Running title: Conserved proline in TM2 for chemotactic GPCR function

Key Words: GPCR, UT, Kiss1R, CXCR4, coupling, migration, adhesion, mutation

*Address for correspondence: Hélène Castel, Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), Université de Rouen Normandie, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
Tel: (33) 235-14-6630; Fax: (33) 235-14-6946.
E-mail: helene.castel@univ-rouen.fr;

Manuscript word count: 17,000 words

8 Figures and 5 Tables

Supplementary Information and 5 Supplementary figures

Abstract

Chemotaxis is currently known as the fundamental phenomenon highly conserved from bacteria to eukaryotic cells, implying cell directed migration along an extracellular chemical gradient whereas chemokinesis results from the stimulation of random cell migration in response to extracellular cues. G protein-coupled receptors (GPCRs) show the ability to detect variable small peptides or chemokine to direct chemotactic cell migration. An outstanding issue is how GPCR machinery may sense gradients of molecular ligands to couple Gαβγ proteins and control in a spatiotemporal way, signaling events leading to chemotaxis.

We address this issue under an evolutionary angle and postulate that the ancestral deletion in TM2 of GPCR belonging to the PEP receptor group (Kiss1R) exhibiting, for most of them, a proline in 2.59, likely yields a repositioning of this proline in 2.58 of SO (urotensine II (UII)/UT) or CHEM (SDF-1α/CXCR4) receptors, for most of them well known for their chemotactic behaviour. Here, we aimed to provide a better understanding of the role of P2.58 in UT and CXCR4 in chemotactic-induced mechanisms, by engineering the P2.59 prototype Kiss1R and the two P2.58 UT and CXCR4 receptors by single mutation of Pro to Ala or insertion/deletion to reposition the Pro.

We showed that wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 expressed in HEK293 cells conserved expression levels and for most, binding capacities. The P2.58 UT and CXCR4 receptors activated by UII and SDF-1α, exhibited $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ and $G_{i/o}$ couplings and stimulated chemotactic migration *via* dynamic wave of assembly/disassembly of focal adhesions (FAs) associated with the selection of one prominent lamellipodia. In contrast, activation of the P2.59 Kiss1R receptor by Kisspeptin (KP-10) evoked $G_q/Ca^{2+}/IP_1$ couplings, and random migration through uncontrolled disassembly of FAs and production of many lamellipodia per cells. Single mutation or insertion/deletion mainly led to loss of G_q and/or G_{i1} and G_{oa} coupling capacities, establishing the key role of the proline in TM2 of Kiss1R, UT and CXCR4 in receptor activation, and showing that P2.59 to P2.58 repositioning likely plays a role in receptor re-sensitization, determinant for regulation of FAs assembly/disassembly and reduction of the number of lamellipodia.

Thus, we propose that P2.58 receptors expanding during evolution, acquired a key competence to favor cell chemotactic migration under external ligand signals. This would be associated with a dynamic of receptor desensitization/resensitization and localized adhesion-de-adhesion waves, selecting protrusions necessary for cell directed migration.

Introduction

Chemotaxis is currently known as the fundamental phenomenon highly conserved from bacteria to eukaryotic cells, implying cell directed migration along an extracellular chemical gradient (Artemenko *et al.*, 2014; Roussos *et al.*, 2011; Pierce *et al.*, 2010) whereas chemokinesis results from the stimulation of cell migration without clear directionality in response to symmetric or asymmetric extracellular lues leading to random migration (Petri *et al.*, 2009). This chemotaxic directional migration involves three main steps consisting in gradient chemosensing, motility and mainly polarity (Swaney *et al.*, 2010). This ability is essential for a number of physiological and pathological processes including embryogenesis and wiring of the central nervous system (Theveneau *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2010), the immune system inflammatory response (Sadik et al., 2012), angiogenesis and cancer cell metastasis and invasion (Roussos *et al.*, 2011; Bravo-Cordero *et al.*, 2011).

It was for along proposed that a local activation of the PI_3K induces local accumulation of PIP_3, stimulating guanine nucleotide-exchange factor GEF proteins leading to the recruitment of the active forms of the Rac and Cdc42 GTPases (Van Keymeulen *et al.*, 2006). These Rac and Cdc42 would allow the establishment of an intracellular molecular gradient leading to disequilibrium between the front and the rear of the cells (Jin *et al.*, 2000). Then Rac may catalyze the polymerization of actin, protrusion at the front edge of the cell and allow through a positive feedback, an accumulation of PIP_3. Cdc42 stabilizes the polarization by acting stabilizing microtubules whereas PTEN and myosin likely localize at the rear of the cell (Funamoto *et al.*, 2002; Lijima and Devreotes, 2002). During the extension of the lamellipodia at the polarized cell front, newborn adhesions (short half-life, 0.2 μm^2) corresponding to integrin aggregation and recruitment of actin, the focal adhesion kinase (FAK), talin and paxillin (Choi *et al.*, 2008) can evolve towards either disassembly, or a Rho-GTase-dependent formation of larger focal complexes (vinculin association, 1 μm^2) or mature focal adhesions (FA, α-actinin association) larger than 2 µm, during the directional migration (Choi, 2011; Lawson, 2012).

Intriguingly, even in the absence of stimulation, the cortical cytoskeleton of the chemotactic cell model *Dictyostelium* amoebae or human neutrophils display constitutive excitability which possibly underlies cell morphological changes and motility (Weiner *et al.*, 2007). It is indeed proposed that cell motility results from coupling of intrinsic signal transduction excitable networks and a cytoskeletal oscillatory network, and various guidance cues that modulate the threshold for triggering signal transduction events, integrated to control and direct the mode of migration (Xiong *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013). Thus,

understanding how extracellular cues are integrated to regulate directional migration remains challenging.

While chemotaxis is a well conserved process, a wide variety of molecules, from small chemicals as cAMP to proteins, can act as chemoattractants (Artemenko *et al*., 2014). Many of them were shown to bind membrane G protein-coupled receptors (GPCRs) such as the cAR1 specific of cAMP in *Dictyostelium* cells (Insall *et al*., 1994) or chemokine GPCRs like Ca5R in human leucocytes (Wietz *et al*., 2001; Sozzani *et al*., 1999). Ligand binding on these GPCRs associated with the heterotrimeric Gαβγ subunits, initiates receptor Gα-GEF activity and βγ release and/or G protein-independent signaling, leading to the activation of downstream effector networks.

In the human genome, GPCRs encoded by more than over 800 genes are the largest family of membrane receptors, classified into several sub-families based on sequence homology and/or common origin (Kolakowski, 1994; Fredriksson *et al*., 2003; Bjarnadottir *et al*., 2006). From the receptor sequences, Fredriksson et al. proposed a yet commonly used systematic classification system named GRAFS formed by the 5 distinct families of *Glutamate* (G), *Rhodopsine-like* (R), *Adhesion* (A), *Frizzled/Taste* (F) and *Secretin* (S). The Rhodopsine-like family showed a clear evolutionary success since containing around 90% of the GPCRs, and thus is divided into the α, β, γ and δ subclasses. The crystallographic structures of Rhodopsine-like family GPCRs indicate a common firm core corresponding to high conserved sequence motifs, *i.e.* E/DRY in the transmembrane (TM) 3, NPXXY on TM7, WXP on TM6, N2.50 in TM2 (X.50, according to the Ballesteros classification : X, numbering of TM; 50, the most conserved residue in the concerned TM) (Ballesteros and Weinstein, 1995), and a water network that can be seen in the binding pocket mediating ligand interactions with the receptor (Tautermann *et al*., 2014). Indeed, the diversity of GPCR functions, and the propensity at mediating chemotaxis, can be related to the various molecular stimulating cues responsible for differential GPCRs conformations and then to the diversity of intracellular pathways they can activate as first effectors, *i.e.* Gα and also βγ proteins, β-Arrestins or G protein-coupled receptor kinases (GRK) (Deupi and Kobilka, 2007, 2010).

Alternate views were provided through ligand-based classification of Rhodopsine GPCRs highlighting the chemical pressure against which the receptors have evolved (Van der Horst et al., 2010; Lin et al., 2013) to explain differential GPCR-mediating mechanisms and more particularly chemotaxis. From phylogenetic analysis by means of an exploratory multivariate "multidimentionnal scaling" (MSD) analyzing the sequence space of non-olfactory Rhodopsine GPCRs and the mutational mechanisms driving their evolution, different

clustering of human GPCRs divided into four groups, characterized by their unusual proline positions in TM2 and TM5. Clusters concern the central group (G0) formed at least in part by the PEP (peptide) receptors, the G1 group including the phylogenetically related SO (somatostatin), CHEM (chemokine) and PUR (purinergic) receptors, the G2 group with Amin (amine) and AD (adenosine) receptors and the G3 group with the remaining receptors (Fig. 1A)(Pelé *et al*., 2011; Chabbert *et al*., 2012). Receptors belonging to SO, containing the urotensin II (UII) receptor UT, CHEM, including the SDF-1α CXCR4 receptor and PUR (Fig. 1A and B) display a P2.58 pattern, specific of this group, resulting from a codon deletion in the TM2 of an ancestor receptor exhibiting a P2.59 pattern belonging to the precursor group G0, such as the OX2 receptor (Fig. 1A and B) or the kisspeptin (Kp-54 or KP-10) Kiss1R receptor of the PEP family (Fig. 1A) (Devillé *et al.,* 2009). Interestingly, previous predictive models (Pelé *et al*., 2011) and crystal structures of the non-olfactory Rhodopsine-like GPCRs, clearly show a TM2 bulge structure in β1/β2-adrenergic, 2A-adenosine or D3 dopamine receptors (G0 group) that possess a P2.59 whereas a kink structure is observed in CXCR4 and δ-Opioid receptors displaying a P2.58, near the ligand binding site (Van der Kant and Vriend, 2014). Experimental evidence of the CHEM-receptor CCR5 (Fig. 1A) suggests the importance of this TM2 region in receptor activation, and the key role of the conserved T2.56 neighboring the P2.58, in the receptor activation/function (Ji *et al.,* 1998; Govaerts *et al*., 2003). In addition, mutation of P2.58 to A2.58 in the angiotensin-II AT-1 CHEM receptor (Fig. 1A), leads to a significant inhibition of transduction cascade (Reis *et al*., 2007, Miura *et al*., 2003). Together, it suggests a key role of this 2.58 proline position in the activation mechanisms of the SO, CHEM or PUR receptors.

These receptors are widely recognized as mediating chemotaxis, thus suggesting that proline kink in the P2.58 may have allowed the capacity of gradient sensitivity, cell polarization and/or directional migration. In the present study, we attempted to elucidate whether the key P2.58 position in the UT (SO) receptor and the CXCR4 (CHEM) allows a specific chemotactic skill. As a P2.59 receptor, we here focused on the Kiss1R as the indel event yielding P.58 receptors arose in ancestors of Kiss1R (Devillé *et al*., 2009). We tried to mimic the "evolutionary" indels by site directed mutagenesis of the UT, CXCR4 and Kiss1R receptors, in order to mimic the biological process that led to the split between P2.58 and P2.59 receptors. We aim, by inserting one residue in the kinked elbow of CXCR4 and UT to favor a bulge structure or by deleting one residue in the bulge elbow of Kiss1R, to induce a kink structure (Fig. 1B-C and D). In addition the roles of the Pro were tested by mutation into Ala for each type of receptors. Expression levels and binding capacity of these receptors,

potential gain and loss of coupling capacities were evaluated in HEK293 cells. The ability to mediate chemotactic migration and adhesion *via* initiation/degradation of FA points, resulting to directional or random migratory properties was also investigated. We showed that the proline position in the TM2 of P2.58 and P2.59 receptors play a major role in G protein-dependent and independent couplings leading to chemotactic migration and destabilization of directed migration favoring random motility, respectively. It is proposed that P2.58 receptor-associated chemotactic migration would be associated to a wave of receptor desensitization/resensitization and localized adhesion-de-adhesion waves.

Materials and methods

Chemicals

Recombinant human SDF-1α was obtained from R&D systems (Abingdon, United Kingdom), and the human UII and kisspeptin-10 (KP-10) were from Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France). Fetal bovine serum (FBS), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), MEM non-essential amino acids, Trypsin-EDTA (0.05%) and antibiotic-antimycotic solutions were provided by GIBCO-Life Technologies (Fisher Scientific, Illkrich, France). Sodium pyruvate solution, fibronectin, poly-L-ornithine, ATP, probenecid, 4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), hematoxilin, normal donkey serum and paraformaldehyde (PFA) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Mowiol 4-88 was from VWR (Fontenay-sous-bois, France). FuGene HD was obtained from Promega (Charbonnières-les bains, France). Cell line nucleofector kit V was from Lonza Sales Ltd (Basel, Switzerland). X-tremeGENE siRNA transfection reagent was obtained from Roche Diagnostics (Meylan, France). Lipofectamine 2000, one shot TOP10 chemically competent *E. Coli*, Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG and coelenterazine *h* were provided by Invitrogen/Life Technologies (Fisher Scientific). Transwells multiple well plates were from Corning (Fisher Scientific). The inositol monophosphate (IP_1) assay, the Tag-lite labelling buffer, the SNAP-Lumi4-terbium donor (BG-K2) and the Tag-lite red agonists KP-10 and SDF-1α were obtained from Cisbio Bioassays (Condolet, France). SuperSignal ELISA Femto Substrate was from ThermoFisher. ECL Prime Western Blotting Detection Reagent was provided by GE Helthcare (Dutscher, Issy les Moulineaux, France). Antibodies raised against c-Myc, FAK, p-FAK (Tyr576/577), the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against rabbit, mouse and goat IgG were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-paxillin (phospho Y31) antibody was purchased from Abcam (Cambridge, Great Britain). Anti-paxillin and anti-integrin β1 antibodies were from Upstate and Chemicon, respectively (Millipore, Molsheim, France). Cell Tracker Green, Fluo4-AM, pluronic acid were obtained from Molecular Probe (Fisher Scientific). Primers were synthetized by Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). The G_q inhibitor UBO-QIC was from the Institute of Pharmacological Biology (University of Bonn, Bonn, Germany). SiRNA (control and G_{13}) were purchased from Dharmacon (GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France). The plasmid pCMV-Myc and pEYFP-N1 were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). pEGFP-N2, ST-pRK5, $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$, $G\alpha_{oa}$

^{Rluc8}, $G\alpha_q^{Venus}$, β_2^{Flag}, γ_2^{Venus}, γ_2^{Rluc8} and β_2-arrestin^{RLuc8} were provided by Dr Laurent Prézeau (IGF, Montpellier, France).

Plasmid constructs

The human UT-P2.58, CXCR4-P2.58 and Kiss1R-P2.59 receptor cDNAs inserted into pcDNA3.1 (cDNA Ressource Center, Detroit, MI, USA) were amplified and each PCR products were subcloned using the enzyme sites of pCMV-Myc, pEGFP-N2, pEYFP-N1 or ST-pRK5 described in Table 1-3. The ΔUT-P2.59^{Myc} and ΔCXCR4-P2.59^{Myc} mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Quick-change site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies, Les Ulis, France) using the UT-P2.58^{Myc} and CXCR4-P2.58^{Myc} receptor cDNAs as a template with two oligonucleotides to insert an Ala in position 2.56 (Table 2 and 3). The ΔKiss1R-P2.58^{Myc} mutant receptor cDNAs were constructed using the same mutagenesis kit using the Kiss1R-P2.59^{Myc} cDNAs as a template and two oligonucleotides to delete the Cys in position 2.56 (Table 1). The ΔUT-P2.58A, ΔCXCR4-P2.58A and ΔKiss1R-P2.59A mutant receptor cDNAs were constructed by mutagenesis using the UT-P2.58, CXCR4-P2.58 or Kiss1R-P2.59 receptor cDNAs inserted into pcDNA3.1 as a template with two oligonucleotides to introduce an Ala in position 2.58 (ΔUT-P2.58A and ΔCXCR4-P2.58A) or 2.59 (ΔKiss1R-P2.59A) instead of the Pro (Table 1-3). The mutant receptor cDNAs were then amplified and each PCR products were subcloned using the enzymes sites of pCMV-Myc, pEGFP-N2, pEYFP-N1 or ST-pRK5 described in Table 1-3. The sequences of all constructs were verified by sequencing (GATC Biotech, Köln, Germany).

Cell culture and transfection

HEK293 cell line (ATCC® CRL-1573™) was generously provided by L. Prézeau, C Barière and I. Bidaud (IGF, Montpellier, France). Cells were cultured in DMEM containing 1 mM sodium pyruvate, 1% antibiotic-antimycotic solution and 10% FBS at 37°C in a humidified incubator (5% CO_2). Transient transfections were performed using FuGene HD, Lipofectamine 2000 or Amaxa Cell Line Nucleofector kit V according to the manufacturer's recommended protocols. Control and G_{13} siRNAs (2 µg) were transfected into HEK293 cells using the X-tremeGENE siRNA transfection reagent 24 h before and at the same time of the transfection with the receptor-expressing plasmid.

Cell-based ELISA

HEK293 cells (4 millions) were transfected with 4 µg empty pCMV-Myc (mock) or plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type and mutant receptors using FuGene HD following manufacturer's instruction. For each transfection, the DNA (µg): FuGene HD (µl) mix ratio was 0.2. The following day, cells were dispensed on poly-L-ornithine-coated 96-wells plate (0.1 mg/mL; 100,000 cells/well) and incubated at 37°C (5% CO_2). Then, after 24 h, cells were treated or not with agonist ligands of the receptors of interest, fixed (4% PFA, 5 min at RT), washed with DPBS, and permeabilized or not with 0.05% Triton X-100. Non-specific binding sites were blocked with DPBS containing 1% FBS (30 min, RT). Primary antibody (Table 4) was then applied for 1h at RT. After washes with blocking buffer, cells were incubated with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Table 4) for 1h. After washes with DPBS, chemoluminescence was detected using SuperSignal ELISA Femto Substrate (ThermoFisher Scientific) and the InfinitePro200 plate reader (TECAN FRANCE, Lyon). Data are expressed as bioluminescence normalized to mock.

HTRF® ligand binding assay

HEK293 cells were dispensed into poly-L-ornithine-coated 96-wells plates at a density of 100,000 cells/well and transfected with 40 ng plasmid encoding ST-tagged wild-type or mutant receptors using Lipofectamine 2000 following manufacturer's instruction. For each transfection, the DNA (µg): Lipofectamine 2000 (µl) mix ratio was 0.2. Then, 24 hours later, the cell culture medium was replaced by 100 nM BG–K2 diluted in Tag-lite labeling medium and incubation was performed for 1h at 37°C in 5% CO_2 atmosphere in order to label ST-tagged receptors with terbium cryptate (Tb). The excess of BG–K2 was removed by washing cells three times with Tag-lite labeling medium. Saturation binding experiments were performed by incubating cells expressing Tb-labeled ST-tagged receptors with increasing concentrations of red ligands diluted in the Tag-lite labeling medium for 1h at 4°C. Signal was detected using the PHERAstar FS plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) on the ARPEGE pharmacology platform (Montpellier, France). The reader was equipped with an HTRF optic module allowing donor excitation at 337 nm and signal collection at both 665 and 620 nm. The signal was collected at both 665 and 620 nm. HTRF ratios were obtained by dividing the acceptor signal (665 nm) by the donor signal (620 nm).

Calcium measurement

HEK293 cells (2 millions) were transfected with 3 µg plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or mutant receptors using Cell line nucleofector kit V (Lonza). Transfected cells were then seeded in poly-L-ornithine-coated 96-well plates at a density of 50,000 cells/wells and incubated for 48h at 37°C with 5% CO_2. Cells were washed twice with a modified HBSS supplemented with 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES and 2.5 mM probenicid (pH 7.4) and incubated with 2 µM Fluo4-AM dye containing 20% pluronic acid for 1 h in 5% CO_2 atmosphere. Cells were rinsed twice with modified HBSS and the effect of graded concentrations of appropriate ligand on $[Ca^{2+}]_c$ was measured with a fluorimetric imaging plate reader FlexStation III (Molecular Devices, Wokingham, England) on PRIMACEN Platform (Mont-Saint-Aignan, France).

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay

For BRET studies to measure G protein couplings, HEK293 cells were dispensed into poly-L-ornithine-coated 96-wells plates at a density of 100,000 cells/well and transfected with 40 ng plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or mutant receptors and at the same time with the different DNA combinations $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$ (20 ng)/β_2^{Flag} (10 ng)/γ_2^{Venus} (10 ng), $G\alpha_{oa}^{Rluc8}$ (20 ng)/β_2^{Flag} (10 ng)/γ_2^{Venus} (10 ng) or $G\alpha_q^{Venus}$ (20 ng)/β_2^{Flag} (10 ng)/γ_2^{Rluc8} (10 ng) using Lipofectamine 2000. For BRET studies to investigate the interaction receptor/β2-arrestin, HEK293 cells were transfected with 50 ng plasmid encoding eYFP-tagged wild-type or mutant receptors and 5 ng DNA encoding β_2-arrestin^{Rluc8}. The following day, cells were washed twice with DPBS. Coelenterazine *h* substrate (10 µl/well) was added at a final concentration of 5 µM. Readings were then immediately performed after the addition of different ligands at room temperature and at 0.5-s intervals during several minutes using the Mithras LB 940 plate reader (Berthold Biotechnologies, Bad Wildbad, Germany) on the ARPEGE pharmacology platform. The plate reader allows the sequential integration of light signals detected with two filter settings (Rluc8 filter, 425 ± 25 nm; and Venus or eYFP filter, 525 ± 25 nm). BRET signal expressed in milliBRET units was calculated as the difference of emission at 530 nm/485 nm. For dose-response data, curves were fitted with a nonlinear regression using Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

IP_1 production measurement

HEK293 cells were dispensed into poly-L-ornithine-coated 96-wells plates at a density of 100,000 cells/well and transfected with 40 ng plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or

mutant receptors using Lipofectamine 2000. Measurement of IP_1 accumulation in HEK293 cells was performed using the IP-One terbium (Tb) competitive immunoassay kit (Cisbio Bioassays). The IP-One assay uses a cryptate Tb-labeled anti-IP1 monoclonal antibody (anti-IP_1-KTb) and a fluorescent d2-labeled IP_1 (IP_1-d2). Twenty four hours after transfection, cells were treated with various concentrations of the appropriate ligands (30 min, 37°C, 5% CO_2) in a stimulation buffer containing LiCl which induced the accumulation of IP1 on receptor activation. Then, cells were incubated with IP_1-d2 and anti-IP_1-KTb in the dark at room temperature for 1h. The fluorescence emission of IP_1-d2 and anti-IP_1-KTb were measured after excitation at 337 nm, at 620 nm and 665 nm respectively, using a PHERAstar FS plate reader on the ARPEGE pharmacology platform. The HTRF intensity was calculated using the following formula and is expressed as arbitrary units: HTRF(intensity) = $((\text{ratio } 665/620)_{sample} - (\text{ratio } 665/620)_{background}) \times 10^4$. Dose-response curves were fitted using Prism GraphPad software.

Migration assays

HEK293 cells (4 millions) were transfected with 4 µg empty pCMV-Myc (mock) or plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type and mutant receptors using FuGene HD following manufacturer's instruction. Transwell filters with 8 µm pores were coated with human fibronectine (20 µg/ml; 12h; 4°C). Twenty four hours after transfection, cells were detached, resuspended in serum-free medium and seeded at a density of 100,000 cells/125 µL/filter on the upper chamber of the Transwells. The gradient was generated by filling the upper and/or the lower chamber with the appropriate ligand. After a 24-h incubation time, filters were rinsed with DPBS. Non-migrating cells were removed from the upper surface of the filter using a cotton swab while cells that migrated through the filter onto the lower surface were fixed with 4 successive baths of methanol (50, 70, 90 and 100%) and then stained with hematoxylin. Filter were removed and mounted on glass slides using Mowiol, and randomly photographed (10 fields/filter) using a Nikon microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Cells on photographic fields were counted using the "Cell counter" plug-in on ImageJ software (U. S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Adhesion assay

HEK293 cells (4 millions) were transfected with 4 µg plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type or mutant receptor using FuGene HD. The following day, cells were incubated with Cell Tracker Green (30 min, 37°C, 5% CO_2), detached with trypsin-EDTA solution, pelleted

(100 g, 5 min) and resuspended in serum-free medium with or without appropriate ligands (10^{-9} M, 30 min, 37°C, 5% CO_2). Cells were then seeded onto fibronectine-coated 96-well plates at a density of 50,000 cells/well. After 30 min, cells were washed and fluorescence of adherent cells was measured at 535 nm using the InfinitePro200 plate reader.

Immunohistochemistry and image analysis

HEK293 cells (2 millions) were transfected with 3 µg plasmid encoded wild-type or mutant eGFP-fused receptor using Cell Line Nucleofector Kit V and plated onto 24-well plate containing fibronectin-coated glass microslides at the density of 75,000 cells/well. After a 24-hour incubation (37°C, 5% CO_2), cells were treated with the appropriate ligand for various time (0 to 60 min). Cells were then fixed with PFA (4%, 10 min), permeabilized with Triton X-100 (0.05%; 5 min) and the non-specific binding sites were blocked with normal donkey serum (2%, 1h, RT). The anti-paxillin antibody (Millipore, ref 05-417) was applied overnight at 4°C. After washes with DPBS, cells were incubated with Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG (2h at RT). Cells were then stain with DAPI (1 µg/mL, 10min) to label nuclei, mounted on glass slides and imaging by confocal microscopy (Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope). The number and size of focal adhesion complexes was calculated using a particle analysis plug-in after successive image treatment by ImageJ software. The proportion of cells exhibiting cytoplasmic and/or cell surface receptor-eGFP was also quantified in each situation.

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM for each group of samples. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.00 software. Comparisons between 2 groups were performed using unpaired *t*-test or Mann and Whitney test.

Results

Experimental mutagenesis of GPCRs to mimic the evolutionary insertion/deletion leading to chemotactic receptor expression and sensitivity

Evolutionary information would help understand factors driving specific acquisition skills, such as chemotactic-motor mammalian cell coordination. Accordingly, a MDS representation of the GPCRs sequence space allows the clustering of four groups. In Figure 1A, a schematic representation of a deletion (gray arrow) that led to the split between the PEP receptors of the G0 group, and the SO receptors at the early stage of the animal evolution (Chabbert *et al*., 2012). Also SO, CHEM and PUR receptors of the G1 groups are phylogenetically related and may have evolved from a common origin (Devillé *et al*., 2009; Pelé *et al*., 2011). In G1 group-composed receptors characterized by a correlated mutation in TM2 and TM5 (*not shown*), the prototype CXCR4 (CHEM, green) and UT (SO, blue) receptors displayed the P2.58 pattern whereas the Kiss1R (magenta) exhibits an ancestral P2.59 (Fig. 1A, inset). As illustrated in the modelized cartoon view of CXCR4 (P2.58, *left panel*) and OX2 (P2.59, *right panel*) receptors (From Chabbert*, unpublished data*), the TM2 is slate and the Pro at 2.58 in CXCR4 is close to the carbonyl groups within a proline kink (a) and the Pro at 2.59 in OX2 is close to the carbonyl groups (b) within a bulge (Fig. 1B). To gain information on chemotactic receptors exhibiting the P2.58 pattern responsible for a kinked structure of TM2, we focused on the Kiss1R-P2.59 activated by the short form KP-10 (10 amino-acids), and on UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 classically bound by the chemokine CXCL12/SDF-1α spliced variant of 89-residue, and the 11 amino acid cyclic neuropeptide human UII, respectively (Fig. 1C). To mimic the evolutionary indel process, we engineered one codon deletion (C2.56) of the Kiss1R-2.59 leading to the production of the ΔKiss1R-P2.58 and one codon (encoding Ala) insertion in between 2.56 and 2.57 positions of UT and CXCR4, leading to the ΔUT-P2.59 and the ΔCXCR4-P2.59 mutant receptors (Fig. 1D). In addition, the putative role of the proline in the TM2 of the 3 wild-type receptors also required the site-directed mutagenesis of the Pro in Ala at 2.59 in Kiss1R (ΔKiss1R-P2.59A) or at 2.58 in UT (ΔUT-P2.58A) and CXCR4 (ΔCXCR4-P2.58A) (Fig. 1D). Modelized TM2 structures of Kiss1R (magenta), UT (blue) and CXCR4 (green) made by Chabbert et al. (*unpublished data*) confirmed the kink in P2.58- and the bulge in P2.59-containing helices (Fig. 1D).

A recent report by Chantreau *et al*. (2015) has investigated the effect on the introduction of a Pro residue in TM2 of the thyrotropin receptor (TSHR) belonging to the LGR family of the G3 group characterized by the absence of Pro in TM2. Some mutants failed to be efficiently addressed at the plasma membrane, suggesting a key impact on the receptor membrane

targeting or stabilization at the plasma membrane. Being part of the well conserved motif TXP, mutation of T2.56 in CCR5 (Govaerts *et al*., 2001) may impair activation or yield constitutive activation, indicating a relatively conserved expression and binding capability. Thus, to verify that the wild-type and mutant receptors may by efficiently expressed, translocated at the plasma membrane and in capacity to bind their respective ligands, all receptor wild-type and mutant constructs were either Myc-epitope-tagged or snap-tagged (ST) and expressed through transitory transfection of HEK293 cells (Fig. 2A). We showed by means of an ELISA bioluminescent assay, that wild type Kiss1R-P2.59 and UT-P2.58, and in a less extent CXCR4-P2.58 were efficiently expressed at the cell surface of non-permeabilized cells (Fig. 2B). Interestingly, the P2.59A or P2.58A receptors displaying a single mutation, exhibited a similar level of plasma membrane expression than wild-types (Fig. 2B). However, the ΔKiss1R-P2.58 appeared higher expressed both within the cytosol and cell surface whereas ΔUT-P2.59 and ΔCXCR4-P2.59 were found to be lower expressed at the cell surface than wild-type receptors (Fig. 2B). These observations led to the conclusion that Pro mutation in Ala or insertion/deletion of one codon leading to the repositioning of the Pro in TM2 of Kiss1R, UT or CXCR4 is permissive for expression and translocations of the receptor at the cell surface, important for investigation of their functional activity.

Interestingly, it was previously observed that the Pro to Ala mutation of the P2.58 of AT-1R (Miura *et al*., 2002), did not markedly alter agonist affinity. We used the method of orthogonal labelling of protein complexes by fluorophore compatible with TR-FRET using the ST (Maurel *et al*., 2008) technology. This ST held by wild-type and mutant receptors can be covalently labelled with the fluorescent non-cell permeable benzyl-guanine-Tb^{3+}-cryptate derivatives to transfer energy with the KP-10-red or SDF-1-red as previously validated (Zwier *et al*., 2010). In the process of writing the paper, experiments using the UII-red were not performed. The intensity of the TR-FRET was markedly increased with the increasing concentrations of the ligand signal and was clearly proportional to the expression levels of the wild-type (Kd=nd, Kiss1R-P2.59; Kd=38.9±6.9, CXCR4-P2.58) and mutant receptors (Kd=47.7±7.0, ΔKiss1R-P2.58; Kd=5.0±0.7, ΔCXCR4-P2.58A; Fig. 2C) (Table 5). Of note, Kiss1R-P2.59 did not show a significant FRET signal intensity highlighting a low membrane expression likely combined with less affinity binding of KP-10-red (Fig. 2C) whereas the ΔCXCR4-P2.59, exhibiting similar amount at plasma membrane than the ΔCXCR4-P2.59A, displayed a diminished affinity for the SDF-1α-red (Table 5, Fig. 2C). Together, it is originally proposed that, by using this strategy to follow tight interaction of the ligand to the N-terminus of the GPCRs, the Kiss1R-P2.59 did not transfer energy, suggesting either

absence of proximity between the ST-N-terminal fragment of this receptor and the ligand likely deeply bound within the receptor core, and/or absence of binding due to the low expression of the receptor at the cell surface. Interestingly, ΔKiss1R-P2.59A and ΔKiss1R-P2.58 displayed the same affinity values than CXCR4-P2.58, likely raising similar conformational changes of the extracellular portions of the P2.58 receptors. At this stage, we expect that UII remained able to bind the wild-type and mutant UT receptors.

Functional coupling properties of P2.59 and P2.58 GPCRs and their Pro to Ala mutants

Previous reports established that Kiss1R-P2.59 exhibits classical coupling to $G_q/IP_3/Ca^{2+}$ pathway and results in inhibition of chemotaxis to FBS (Kotani *et al.*, 2001, Ohtaki *et al.*, 2001), UT-P2.58 functions as a pleiotrope factor, activating G_q/PLC/Ca^{2+}, $G_{i/o}/PI_3K$ and G_{13}/Rho/Rock cascades (Jarry *et al.*, 2010; Brulé *et al.*, 2014, Lecointre *et al.*, 2015), and CXCR4-P2.58 recruits $G_{i/o}/PI_3K$ and $G_{12/13}$/Rac signaling (Horuk *et al.*, 1998, Zlotnik *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2012). Thus, in order to evaluate whether the deletion in Kiss1R-P2.59 would have allowed acquisition of some important G protein couplings involved in chemotactic receptor behavior, *i.e.* $G_{i/o}$ combined to $G_{12/13}$, we next investigated the panel of G proteins activated by wild-type and mutant receptors by using BRET-based biosensors directly monitoring the activation of $G\alpha_q$, $G_{\alpha i}$ and $G_{\alpha o}$ proteins ($G_{\alpha 12/13}$ being non available) occurring early and shortly after receptor activation (cartoon of Fig. 3A), as well as their direct effectors. As often observed, wild-type and mutant CXCR4 receptors expressed in HEK293 cells totally failed to recruit $G\alpha_q$, produce inositol phosphate IP_1, and stimulate cytosolic Ca^{2+} concentration $_c[Ca^{2+}]$ (Fig. 3B, *Right*). However, the Kiss1R-P2.59 markedly coupled and activated $G_{\alpha q}$ (pEC_{50}=-8.17±0.14), IP_1 production (pEC_{50}=-9.58±0.15) and $_c[Ca^{2+}]$ increase (pEC50=-7.78±0.13) and ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 lost G_q and Ca^{2+}-effector activations, still able to induce IP_1 production, but with a drastic shift affinity in the IP1 assay (Table 5)(Fig. 3B, *Left*). UT-P2.58, originating from the SO family, also showed a net ability to recruit Gαq, evoke IP_1 formation and generate $_c[Ca^{2+}]$ with affinities similar to that of Kiss1R-P.59 (Table 5) (Fig. 3B, *middle*). Interestingly, ΔUT-P2.58A and ΔUT-P2.59 failed to recruit G_q and Ca^{2+}, but kept the ability to induce IP_1 production with a drastic decrease of efficacy for the Pro to Ala UT mutant (Fig. 3B, *Middle*). Then, $G_{\alpha i1}$- and $G_{\alpha oA}$-Rluc dissociations from Gβγ-venus (Fig. 3A) were investigated in HEK cells expressing the wild-type and mutant receptors. Clearly, we confirmed that Kiss1R-P2.59 did not couple to $G_{i/o}$ proteins under stimulation by KP-10, and mutants of this receptor failed to allow this type of coupling (Table 5, Fig. 3C). In contrast and as attended, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58

activated $G_{\alpha i}$ (pEC_{50}=-9.03±0.38, pEC_{50}=-9.2±0.13, respectively) and G_o recruitment with similar affinities (pEC_{50}=-9.68±0.24, $pEC_{50=-9.52}$±0.52, respectively). The deletion of one codon leading to ΔUT-P2.59 and ΔCXCR4-P2.59 provoked a total inhibition of the $G_{i/o}$ couplings, suggesting the major role of this proline in 2.58, for activation of $G_{\alpha i/o}$ protein receptor coupling (Fig. 3C). Taken together, the data above provide evidence of a general loss of G_q/Ca^{2+}, $G_{i/o}$ couplings when changing position or mutating the proline in the three receptor types, but it would appear that this proline in either receptor may favor a subtle constitutive activity.

Chemotactic migratory and/or motility properties of the P2.58 and P2.59 receptors

Despite the almost complete loss of coupling to $G_{i/o}$ and G_q proteins, but also in the absence of the control of $G_{12/13}$ potential recruitment of the mutant receptors, the migratory potential of cells expressing wild-type Kiss1R or the chemotactic UT and CXCR4 receptors, was evaluated in the boyden chamber assay allowing ligand gradient concentration (Fig. 4A). Concentration gradient of KP-10, UII and SDF-1α induced migration of cells expressing either Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 compared with HEK-pCMV^{Myc} (mock) and control (untreated) cells, respectively (Fig. 4B). We hypothesized that the P2.58 position plays a key role in the acquisition of specific "binding-activation" coupling properties of GPCRs leading to chemotactic behavior, meaning that a gain of migratory behavior was expect for the ΔKiss1R-P2.58 receptor and a loss of migration for ΔUT-P2.59 and ΔCXCR4-P2.59 was attempted. But, when the Pro was shifted in 2.58 or mutated in Ala, KP-10 failed to induce chemoattraction/motility of cells expressing ΔKiss1R-P2.59A and ΔKiss1R-P2.58, respectively, whereas P2.58A or P2.59 mutants of UT and CXCR4 still conserved their ability to promote significant migration/motility (Fig. 4B), and even acquired increased motility (Table 5) (Fig. 4B). We next explored whether this enhanced migration for the ΔUT-P2.59 or the loss of migration for the ΔKiss1R-P2.58 results from a shift in affinity for some coupling-induced migration. Thus dose-response curves generating by plotting the concentrations of the various agonists KP-10, UII or SDF-1α in the bottom chamber, gave three distinct profiles of migration yielding the better functional affinity (pEC_{50}=-10.41±0.58) for UT-P2.58 showing a bell shaped curve suggestive of adhesion properties under gradient rupture as previously shown (Lecointre *et al.*, 2015) and similar affinities for Kiss1R-P2.59 and CXCR4-P2.58 (pEC_{50}=-9.12±0.16 vs pEC_{50}=-8.12±0.4). Interestingly, the ΔUT-P2.59 likely exhibited a shift in affinity (pEC_{50}==-9.49±0.3) and more resembling that of the Kiss1R-P2.59 (Table 5, Fig. 4C). This last observation tends to suggest that although it is not possible to initiate

acquisition of some migratory chemotactic features in Kiss1R by generating an experimental deletion, the repositioning of the Pro in 2.59 in UT receptors (directly evolving from a common PEP receptor family), allows Kiss1R-P2.59-like migratory response.

GPCR-induced chemotaxis has been shown to depend on the $G_{\alpha i}$ and $G_{\beta\gamma}$/PI3K pathway and/or involving $G_{\alpha 12/13}$/Rho/Rac kinase cascade (Lecointre *et al.*, 2015), we examined whether inhibition of $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha 13}$ would be associated with the pro-migratory activity of Kiss1R and UT receptors. Downregulation of $G_{\alpha 13}$ through a specific siRNA previously validated (Lecointre *et al.*, 2015) failed to modify the marked amplitude of migratory response induced by KP-10 on Kiss1R-P2.59-expressing cells (Fig. 4D) or by UII towards ΔUT-P2.59-expressing cells, but totally abolished the UII-induced directional migration of UT-P2.58-expressing cells (Table 5, Fig. 4D). Conversely, when G_q was blocked by the specific inhibitor of the G_q/Ca^{2+} pathway UBO-QIC, validated on the ability of UII to provoke a $_c[Ca^{2+}]$ mobilization (Fig. S1A), the Kiss1R-P2.59-expressing cells did not migrate towards KP-10, while UT-P2.58-expressing cells remained motile (Fig. 4E). Again, the ΔUTP2.59-mediating migration likely resembling the Kiss1R-P2.59 phenotype, was insensitive to the downregulation of $G_{\alpha 13}$ (siRNA) and totally blocked by UBO-QIC (Fig. 4D). These data reinforced the idea that the ΔUT-P2.59 can mimic the Kiss-1R-mediating migration relayed mainly by G_q instead of G_{13} proteins. Recently, studies have shown that p63RhoGEF can physically interact with Gαq to stimulate the GEF activity of p63RhoGEF (Goedhart *et al.*, 2013). Because it was demonstrated that the Gαq-p63RhoGEF interaction competes significantly with PLCβ activation and $_c[Ca^{2+}]$ increase, we verify whether this Gq/p63RhoGEF may be involved in the pro-migratory properties of KP-10. SiRNA directed against p63Rho-GEF did neither bias the Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58-evoked $c[Ca^{2+}]$ rise discarding this potential mechanism in the non-classical KP-10 induced migration in a Gq-dependent manner (Fig. S1B). It was previously shown that chemotactic migration involves adhesion relayed at least in part by a pertussis toxin (PTX) $G_{i/o}$ protein (Lecointre *et al.*, 2015). PTX was then tested and slightly diminished the KP-10-induced Kiss1R-P2.59 cell migration but totally and partially abolish the UII-evoked UT-P2.58 and ΔUT-P2.59 cell migration, respectively (Fig. S2), suggesting that the residual motile behavior results from the acquisition of other couplings (G_q) induced by the P2.59 position. However, the question remains about the chemotactic or pro-motile behavior of Kiss1R and wild-type or mutant UT receptors. Disruption of the ligand gradient in boyden chambers would affect directional cell migration by favoring random migration or motility in the case of chemokinesis receptor-mediating activity, or by inhibition of migration through reinforcement of homogenous

distribution of adhesions, suggestive of a receptor-exhibiting chemotactic behavior. Addition of KP-10, UII or SDF-1α to the bottom and the upper compartments of the migration chamber produced a significant blockade of UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 cell migration (Fig. 4F) or increase in the number of migrating Kiss1R-P2.59 and ΔUT-P2.59 cells compared with the non-treated condition, and similar to the gradient condition where ligands were only incubated in the bottom compartment (Fig. 4F). Together, it strongly suggests a reduction of cell motility and promotion of adhesion processes in the wild-type chemotactic UT and CXCR4 displaying the P2.58, or chemokinesis mechanism induced by the wild-type Kiss1R and the UT mutant yielding P2.59.

Controlled adhesion as a key signature of P2.58 chemotactic receptors

During chemotaxis, adherent cells exhibit a propensity to adhere to substratum as already reported for UT and CXCR4 (Lecointre *et al*., 2015; Coly *et al*., 2016; Monterrubio *et al*., 2009; Glodek *et al*., 2003), often accompanied by integrin activation clustering and FAK activation (Grieco *et al*., 2011). Indeed, homogeneous concentrations of KP-10, UII or SDF-1α were tested in the adhesion assay on cells expressing wild-type and mutant P2.59 and P2.58 GPCRs. Consistent with the previous observations suggesting chemokinesis mediated by P2.59 receptors, we showed that the wild-type Kiss1R-P2.59 or the mutant ΔUT-P2.59 and ΔCXCR4-P2.59 did not significantly reinforce cell–matrix adhesion after 15 min incubation in the presence of the respective receptor agonist (Fig. 5A). In contrast, the deletion leading to the mutant ΔKissR-P2.58 slightly but significantly allowed acquisition of cell adhesion properties (by 115.0±4.2%) to the fibronectin matrix, a mechanism similar to the UII- and SDF-1α-mediated adhesion of UT-P2.58- (137.2±5.1) and CXCR4-P2.58- (269.4±14.3) expressing cells (Table 5; Fig. 5A). It was previously established the role $G\alpha_{i/o}\beta\gamma$ on adhesion-induced by chemotactic-receptors (Lecointre *et al*., 2015), but since ΔKiss1R-P2.58 receptor was unable to induce dissociation of $G\alpha_{i/o}$ and βγ G protein subunits, the coupling/effector mediating mature adhesion remain to be identified and how these adhesion points relay migration must be evaluated.

During cell migration, transient adhesive contacts occur at the leading edge of lamellipodia where integrins recruit proteins such as vinculin or paxillin to form immature adhesive contacts called focal complexes, and transition to mature FA is marked by increase in size (Jarjour *et al*., 2011). A recent description of events occurring during protrusion emission establishes that nascent FAs rapidly recruit paxillin and FAK, that tension-engaged integrins promotes FAK activation and rapid tyrosine phosphorylation of paxillin (P-paxillin) (Case *et*

al., 2015). We used these dynamic oscillations in FAs by following paxillin, FAK and integrin accumulation. ELISA assays were performed with specific antibodies directed against total and phosphorylated forms of Paxillin (P-Paxillin), respectively, as described in Materials and Methods. Here, even if preliminary, treatments with KP-10 or UII after 30 min, appeared to stimulate P-Paxillin of 172.7±22.5% and 170.7±19.0% at 30 min on cells expressing specifically the ΔKiss1R-P2.58 and UT-P2.58 receptors (Fig. 5B). When cells expressed the wild-type Kiss1R-P2.59 or the mutant ΔUT-P2.59, ligands failed to induce P-Paxillin, suggesting the absence of nascent focal complex adhesions when receptors exhibit a proline position in P2.59. Moreover, the number and size of mature FAs can be also evaluated by imaging paxillin staining in HEK-cells transiently transfected with cDNA encoding P2.59-^{eGFP} or P2.58$^{e\text{-}GFP}$ receptors. We observed differences in the overall number of FA-paxillin-positive structures within the cells both at in the absence of stimulation (randomly distributed) in cells expressing Kiss1R-P2.59 and UT-P2.58 receptors (Fig. 5C). In the presence of homogenous KP-10 or UII treatments, cells harbored increased number of FAs after 30 min as illustrated by the larger and longer FAs in activated expressing cells (Fig. 5C), but interestingly, this stimulation appeared significantly present at 15 and 30 min, but transient for the Kiss1R-P2.59 and sustained for UT-P2.58 (Fig 5C and D). When basal level of FAs was compared between wild-type and mutant receptors, it appeared that the constitutive FAs complexes are significantly reduced in P2.58 receptors compared with P2.59 receptors, likely indicating basal control of the adhesion properties of cells under expression of P2.58 or P2.59 GPCRs, P2.58 leading to less adhesion (Fig. 5D). At this stage, KP-10 modestly stimulated FA number in ΔKiss1R-P2.58 receptor-expressing cells at 30 min whereas UII evoked a non-attended significant inhibition of FAs of ΔUT-P2.59 cells at 15 and 30 min (Fig. 5D). Since it was proposed that migration results from nascent FA composed of talin-integrin-actin linkage evolving towards FA maturation initiated by FAK-dependent paxillin phosphorylation (Case *et al*., 2015), we aimed to confirm a potential occurrence of FA maturation. We confirmed that the known chemotactic receptor UT-P2.58 evoked β1 integrin activation of 144.0±4.2% and 149.1±7.9% (Fig. 5F) and phosphorylation of FAK by 170.7±19.0% and 134.9±7.2% (Fig. 5F) at 30 and 60 min respectively. When the Pro was repositioned in the ΔUT-P2.59, UII was totally inefficient in recruiting integrins and FAK activity (Fig. 5E and F). As a mirror experiment, the wild-type Kiss1R-P2.59 did not induce any effect on these two components, whereas the mutant ΔKiss1R-P2.58 showed a tendency to both favored integrin clustering (Fig. 5E) and phospho-activation of FAK (Fig 5F). These data allow us to begin constructing a hypothesis about cell-specialization associated with the expression of P2.58 or

P2.59 GPCRs. Even in the absence of G protein couplings, P2.58 receptor would regulate a controlled maturation of FAs from nascent one, recruiting integrins and FAK, constituting a necessary step to induce chemotactic migration instead of P2.59-induced random motility involving short half-life formation of nascent adhesions.

Connection between receptor desensitization, adhesion and lamellipodia formation in P2.58 receptor-induced chemotactic migration

FAs direct migration in part by mechanically generating forces for movement, but rapid cycles of FA assembly and disassembly, or turnover, at the leading edge of migrating cells are necessary for productive FAs and directional migration (Gardel *et al*., 2010; Geiger and Yamada, 2011; Wolfenson *et al*., 2013). Thus, it can be questioned here how P2.58 and P2.59 receptors interfere with FA disassembly by spatiotemporal visualization of FA during ligand activation.

UT-P2.58 cells exposed to UII during 5 to 60 min, evoked a transient reduction of the number of adhesion points (61.7±8%) at 5 min, a progressive increase level of FAs significant at 20 min (152.5±15.3%, P<0.001) (Fig. 6A, red and 6B), and then, the same level of FA number at 60 min than at 5 min 56.9±9.4% (Fig. 6A and B), suggesting a "wave-like" adhesion number dynamic mediated by the P2.58 receptors. The transient decreased number of FAs is concomitant to a transient increase of the area of FAs at 5 min, then followed by reappearance of nascent-small sized FAs until 20 min of exposure (Fig. 6C). At 60 min, all large FAs were found absent while nascent (>FAs significantly increased compared with the 20-min condition (Fig. 6C). However, we confirmed that ΔUT-P2.59 expressing cells displayed less adhesions in non-treated condition, and when activated, likely conserved the propensity to transiently inhibit the FAs number at 5 min (34.2±5.5%) and 60 min (54.2±5.4%) (Fig. 6A and B), paralleled by the slight decrease of the larger FAs complexes (Fig. 6C), likely evoking a dysregulation of the adhesion/deadhesion cycle. This may indicate that P.58 activates effector cascades that could be determinant for the regulation of mature FAs and nascent one, and directional migration.

It was originally proposed that most of the chemotactic GPCRs are uniformly distributed at the plasma membrane and that polarization of migration cells depends on asymmetric receptor activation along the gradient establishment rather than on its distribution (Blaser *et al*., 2006; Xu *et al*., 2007). An important process in localized receptor activation at the leading edge of the migrating cells may be endocytosis (Jekely *et al*., 2005, Cao *et al*., 2014), involving β-arrestins. Recently, novel roles of arrestins have emerged as regulators of cytoskeleton

proteins (Mittal *et al.*, 2013) or protein ubiquitination (Shenoy, 2014). Based on the hypothesis that desensitization and recycling of chemokine receptors are essential for chemotaxis, and that chemotaxis likely involves dynamic of adhesion/de-adhesion, we performed the quantification of the number of cells exhibiting UT-P2.58^{eGFP} or ΔUT-P2.59^{eGFP} fluorescence exclusively at the plasma membrane, at both plasma membrane and/or cytosolic compartments. It aimed to provide imaging the dynamic of the distribution of the P2.58 and P.59 receptors under 60-min-treated conditions with UII and during cell movement. In the absence of UII, a majority of cells presented an exclusive membrane surface labelling (Fig. 6A). After treatment, a progressive translocation of UT-P2.58 receptors within endocytic vesicles reaching 87.5% of cells after 10 min was detected (Fig. 6D). Surprisingly, the proportion of cells with both membrane and endocytosed receptors decreased from 50% (10 min) to 20.8% (15 min) whereas more receptors reached the cell surface (Fig. 6D). Again, at 20 and 60 min, a new phase of UT-P2.58 internalization occurred (Fig. 6D), confirming a wave profile for the receptor traffic between cytosol and membrane surface. Similar observations demonstrating a regulating cycle of adhesion formation and degradation, FA size and receptor endocytosis has been observed for the wild-type CXCR4-P.2.58, even if the kinetic of this wave appeared greatly slower (Fig. S3). Cell expressing the ΔUT-P2.59 did not show exclusive membrane expression, suggesting a constitutive endocytic activity, whereas, at 5 min stimulation, receptors appeared to by translocated to the cell surface in 30% of activated cells (Fig. 6D). Finally, the ΔUT-P2.59 progressively internalized in a higher proportion of cells reaching a maximum at 20 (84.6%) and 60 min (69.6%) (Fig. 6D), following a similar kinetic wave than adhesions. It has been shown that various receptors that required β-arrestins for chemotaxis and actin cytoskeleton reorganization also promote β-arrestin-dependent association with mitogen-activated protein kinases MAPK (DeFea *et al.*, 2007). In particular, many studies have suggested that β-arrestin-dependent ERK1/2 is important for actin reorganization and/or chemotaxis. Previous works (Brulé *et al.*, 2014, Lecointre *et al.*, 2015) and our preliminary experiments indicated that UII induces two phases of stimulation of phosphorylated forms of ERK1/2 (P-ERK-1/2) in cells expressing UT-P2.58, suggesting again, a wave activity of ERK (Fig. S4), whereas the ΔUT-P2.59 remained able to stimulate the first phase of ERK1/2 activation. Even if these data need to be confirmed, it suggests that the second phase of P-ERK, specific of P2.58 receptors, is β-arrestin-2-dependent as previously demonstrated (Brulé *et al.*, 2014).

To verify this assumption, recruitment of β-arrestin-2 to the receptors was assessed by an increase in the BRET signal in HEK cells transiently expressing UT-P2.58 and ΔUT-P2.59

fused to their C-terminal to YFP, and β-arrestin-2 fused to R-Luc. Following UII application, β-arrestin-2 was recruited by the UT-P2.58 after stimulation (Fig. 6E). However, in the same conditions, the ΔUT-P2.58A and the ΔUT-P2.59 failed to interact with β-arrestin-2 (Fig. 6E) indicating that the proline in TM2 of chemotactic receptors plays a major role in the recruitment of β-arrestin-2. Together, it can be proposed that the Pro position in 2.58 in the prototypic chemotactic UT is involved in the regulation of the wave of plasma membrane distribution of the receptor, the cycle of adhesion assembly and disassembly during the time of ligand-exposure.

In order to verify whether the receptors exhibiting the Pro in P2.59 may act differently on this complex regulation system, similar experiments were conducted with the PEP receptor Kiss1R prototype. Kiss1R-P2.59 cells exposed to KP-10 during 5 to 60 min, evoked a first peak of adhesion point (190.6±16.4%, 5 min) followed by a relative stabilized higher level of FAs as illustrated in the imaging panel (Fig. 7A, red) and on quantification histograms (Fig. 7B). Again, as already detected in the Figure 5C, the ΔKiss1R-P2.58 when activated, provoked a decreased number of the total FAs/cell area (Fig. 7B). These two types of adhesive-mediating effects were accompanied by an increase of the area of the FAs suggestive of initiation of maturation with size > 0.1 μm^2 markedly increased and remained constant during the treatment period (60 min) (Fig. 7C). In ΔKiss1R-P2.58 cells, a tendency to a slight and transitory size enhancement can be detected (Fig. 7C), suggesting a potential delayed adhesion capability (Fig. 7C). The localization of the ΔKiss1R-P2.58 likely at the plasma membrane during all the treatment period strongly indicates alteration in the mutant trafficking and thus a clear connection between receptor activated-state at the membrane surface and adhesion FA areas. We also evaluated the level of endocytosed/internalized wild-type and mutant Kiss1R receptors in HEK293 cells in non-treated and 60-min-treated conditions. In the absence of receptor activation, it was already observed among the total of cells evaluated, more than 50% exhibiting a clear internalized phenotype (intracellular and membrane and intracellular labellings). After treatment (KP-10), a net increase of the distribution of the Kiss1R-P2.59 at the plasma membrane after 5 min, and a return to the cytosolic distribution similar to control occurred until 20 min (Fig. 7D). Then a marked internalized profile of the receptor after 60 min of homogenous exposure to KP-10 (Fig. 7D) was shown, suggesting a relative resistance to ligand-induced internalization until more than 1h continuous activation. In cells expressing ΔKiss1R-P2.58, almost all receptors were expressed at the plasma membrane in control and treated conditions, except at 20 and 60 min post-treatment showing endocytosed receptors in 30% and 82.1% of cells (Fig. 7D).

According to this observation, our preliminary experiment failed to demonstrate the interaction of β-Arrestin 2 of the wild-type Kiss1R-P2.59 but also of the ΔKiss1R-P2.59A and Kiss1R-P2.58 after 15 min stimulation with KP-10, even if we may expect a slight tendency whatever the condition, needing to be confirmed (Fig. 7E). Thus, we propose that even if the ΔKiss1R-P2.58 would have probably lost its G_q couplings and traffic regulation, it seems that a faint competence has been obtained leading to a rebound in adhesion number, FA size, and in endocytosis at 20 min, suggesting a functional activity acquisition due to the P2.58 positioning.

We then aimed at determining the potential link between this cycle of receptor endocytosis and cell migration/motility. Indeed, extensive experimental evidence of lamellipodia are the site of protrusion (Pollard and Borisy, 2003), and formation for most cell-matrix adhesions (Webb *et al*., 2002) where integrin binding to extracellular matrix proteins and subsequent clustering leads to the formation of nascent focal complexes. To discriminate random type motility or chemokinesis mediated by the Kiss1R-P2.59 from chemotaxis mediated by the UT-P2.58, we evaluated the number of cell lamellipodia during the course of the treatments of cells expressing P2.58 and P2.59 receptors. At basal condition (non-treated), cells expressing UT-P2.58 and ΔUT-P2.59 receptors exhibited zero or one lamellipodia at 98% and 80%, respectively (Fig. 8A and B). During the course of the treatment with UII, the proportion of cells with one lamellipodia increased and stabilized until 60 min, while those with two lamellipodia transiently rose until 10 min, and then decreased reaching control values for UT-P2.58 (Fig. 8A). For ΔUT-P2.59, the number of cells with more than 2 lamellipodia progressively increased during the treatment when the number of cells with only one lamellipodia was depressed after 15 min stimulation. The regression of the probability to display more than two lamellipodia appeared concomitant to resensitization of the receptor at the plasma membrane, while specific of P2.58 receptors (Fig. 8A and B). In cells expressing Kiss1R-P2.59, KP-10 evoked a stimulation of the proportion of cells with more than 2 lamellipodia from 39% (control) to 69.2% (5 min) and maintained until 20 min (70%) at the expense of 0 or 1 lamellipodia-containing cells (Fig. 8C and D). Of note, when receptors internalized at 60 min, cells appeared to express only one lamellipodia (Fig. 8D). Again, in ΔKiss1R-P2.58 cells, no important reactivity was observed, except, the tendency to emit one lamellipodia, concomitantly to the disappearance of the receptors from the plasma membrane at 20 min of treatment (Fig. 8D).

Thus, the specificity of the temporal regulation of receptor trafficking and adhesion assembly and disassembly leading to the selection of one lamellipodia at the expense of more

than one, belongs to the P2.58 receptors likely allowing directional cell migration. The absence of regulation of FA degradation associated with no controlled desensitization/re-sensitization of P2.59 receptors, allow random motility *via* the development of a number of lamellipodia per cells.

Discussion

A large family of GPCRs shows the ability to detect variable small peptides or chemokine to direct chemotactic cell migration. One of the current goal is to understand how GPCR machinery may sense gradients of molecular ligands to couple Gαβγ proteins and control, in a spatiotemporal way, signaling events leading to chemotaxis. We address the issue of the role of chemoattractant receptors under an evolutionary angle. Indeed, it is here postulated that the ancestral deletion in TM2 of G0 receptor family including the PEP (Kiss1R-P2.59) subclass exhibiting for a majority a P2.59 (Fig. 1A), likely yields a P2.58 in receptors of G1 group with SO (UT), CHEM (CXCR4) or PUR (Fig. 1A). Based on an original method of receptor classification, detailed analysis of helical distortions and crystallographic structures of Rhodopsine GPCRs confirming a kink structure of TM2 in P2.58 receptors (Fig. 1B), we intend to provide new insights into chemotactic receptors and a better understanding of their activation mechanism. Engineering the P2.50 prototype Kiss1R and the two P2.58 UT and CXCR4 prototypes by single mutation of Pro to Ala or insertion/deletion to reposition the Pro, was performed to gain information on the receptor folding, binding properties, couplings and involvement in migration/adhesion. Our work highlights the major role in PEP, SO and CHEM GPCRs of the proline in TM2, in activation and G protein couplings, and the key impact of its repositioning from P2.58 to P2.59 regulating spatiotemporally cell surface receptor availability and adhesion/deadhesion properties, likely responsible for a switch, *i.e.* chemotactic behaviour to chemokinesis random migratory properties.

Specific signallings of the chemotactic UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 compared with the peptide receptor Kiss1R-P2.59

We demonstrate that activation of UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 expressed in HEK293 cells by UII and SDF-1α, respectively, induces various couplings to different signaling pathways. For the UII/UT-P2.58 system, we observe normal traffic to the plasma membrane, recruitment of G_q, $_c[Ca^{2+}]$ and polyphosphoinositid mobilization, G_{i1} and G_{oa}, and β-Arrestin-2 and downstream events, including a potential $G_{\alpha 13}$ activation, two phases of ERK activation and two phases of endocytic/internalization processes. These data are in agreement with the previous studies demonstrated UT-P2.58 receptor direct couplings to G_q, G_{i1}, G_{oA}, G_{13} proteins and β-Arrestin 1 and 2, and the downstream events ERK1/2 (Brulé *et al.*, 2014) or indirect signaling *via* $G_{q/11}$ and $G_{i/o}$ proteins (Tzanidis *et al.*, 2003; Jarry *et al.*, 2010), protein kinase C, P38, MAPK, ERK1/2 and Rho/ROCK cascades (Rossowski *et al.*, 2002; Grieco *et*

al., 2011; Lecointre *et al*., 2015). However, for the SDF-1/CXCR4 system, it is rather shown the non-coupling to G_q and the absence of stimulation of $_c[Ca^{2+}]$ and IP_1 production, while couplings to G_{i1} and G_{oA} proteins, recruitment of β-Arrestin 2 but also cyclic control of cell surface expression during activation, and concomitant adhesion disassembly. These observations indicate that in HEK293 cells expressing human recombinant receptors, common couplings/functions can be found between CXCR4-P2.58 and UT-P2.58. Indeed a number of studies previously demonstrating that several CXCR4-mediated effects are relayed by $G_{\alpha i}$ and $G_{\beta\gamma}$ proteins as well as β-Arrestin 2 (Busillo and Benovic, 2007), or GRKs (Busillo *et al*., 2010) inducing uncoupling from G protein and receptor recycling or internalization (Pozzobon *et al*., 2016). However, our CXCR4-P2.58 signaling studies otherwise stress distinct properties than UT-P2.58, as exemplified by the absence of specific G_q/Ca^{2+}/PLC pathway. This aspect appears to be in controversy with the previous studies, demonstrating that $G_{\beta\gamma}$ dimer would trigger PLC-β activation, hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) into inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and then IP3 production leading to Ca^{2+} mobilization (Mellado *et al*., 2001; Rubin, 2009). But clearly, there is still much to know about how specific G protein composition contributes to cell-specific responses to SDF-1α. Here, we do not detect G_q as well as Ca^{2+} couplings, this may be explained by i) a potential activation involving sequential G_i-G_q effects, as for the adrenergic receptor where initial G_s/cAMP/PKA activity mediates receptor phosphorylation leading to a switch towards G_i (Daaka *et al*., 1997), and/or ii) the potential co-expression/heterodimerization with other receptors blocking or favoring the SDF-1α-induced $_c[Ca^{2+}]$ increase, as reported for the CXCR4-CXCR7 (Levoye *et al*., 2009) and the CXCR4-CCR5 heterodimers (Contento *et al*., 2008). Thus, even if the G_{io} and β-Arrestin 2 couplings of CXCR4 appears compatible with the well-known mechanisms described in the literature (Pozzobon *et al*., 2016), we chose here the UII/UT system as a good candidate/prototype for P2.58 receptor-mediating signaling pathways for chemotaxis. As comparison, we made the option to work on the Kiss1R-P2.59 receptor for comparison with UT and CXCR4. Our work, clearly demonstrate the Kiss1R-P2.59-Gαq coupling, PIP metabolism and $c[Ca^{2+}]$ mobilization, but also the ras-ERK1/2 pathway. In contrast, Kiss1R failed to recruit G_{i1} and $G_{oA,}$ and also, in our study, β-arrestin 2 in HEK293 cells. These are, globally, in total agreement the classically established G_q/PLC/Ca^{2+}/PKC couplings, and ERK1/2 activation (Cvetkovic *et al*., 2013; Castano *et al*., 2009). Concerning the difficulty here to measure β-arrestin 2 coupling to the Kiss1R-P2.59, associated to the very surprising inability to bind the KP-10 in our HTRF technological strategy can be explained by the constitutive associated GRK2 and/or β-Arrestin 1 and 2 to

the receptor, and the potential constitutive G protein-uncoupled Kiss1R-β-arrestin dependent internalization (Pampillo *et al*., 2009). Accordingly, recent studies proposed that the bulk of internalized Kiss1R is rapidly recycled back to the cell surface with little being targeted for degradation (Bianco *et al*., 2011). Thus, Kiss1R-P2.59 may be dynamically recycled providing a constant amount of binding and signaling of Kiss1R upon KP-10 stimulation (Bianco *et al*. 2011). Collectively, our data establish similarities and differences in the signaling pathways activated by P2.58 and P2.59 receptors, strengthening the central node of the Gαiβγ and β-Arrestin 2 in P2.58 receptors, in the absence of the evaluation here of the $G_{\alpha12}/_{\alpha13}$ protein couplings. Thus, the question on how these P2.58 receptors control specifically chemotaxis instead of their slight differences, remains to be clarified.

Events shared by chemotactic UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 to allow cell chemotaxis versus chemokinesis

Chemoattractant GPCRs such as CXCRs, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), C5a, AT-1 or leukotriene B_4, from a subfamily that all couple a PTX-sensitive cAMP-inhibitory $G\alpha_{i\ protein,}$ induce directed cell migration. Here, we confirmed the pleiotropic activity of UT-P2.58, recently associated with a major role in cell migration and survival (Brulé *et al*., 2014, Grieco *et al*., 2011). More specifically, we previously demonstrated in glioma cells, that a gradient concentration of UII induces a G_{13}/Rho/ROCK cascade in the one hand, and a $G_{i/o}$/PI3K pathway in another hand, mediating chemotactic migration (Lecointre *et al*., 2015). These findings were highly consistent with the previously proposed multiple coupling to $G_{\alpha13}$/ROCK and $G\alpha_{i/o}$/PI3K cascades displayed by the professional chemotactic CXCR4 (Tan *et al*., 2006; Rubin, 2009). In contrast, activation of Kiss1R-P2.59 was almost systematically described as a metastasis suppressing factors in melanoma, breast cancer (Lee *et al*., 1996; Lee and Welch, 1997) or ovarian carcinoma cells (Jiang *et al*., 2005). For instance, activation of Kiss1R-P2.59 by KP leads to G_q coupling and subsequent inhibition/modification of cell migration and invasion (Li *et al*., 2012; Navenot *et al*., 2009).

In the present study, we tested the effect of UII and SDF-1 or KP-10 at activating UT-P2.58, CXCR4-P2.58 or KISS1R-P2.59 in their ability to induce chemotaxis and/or chemokinesis of recombinant HEK cells. In the boyden chamber assay, UII and SDF-1 mediate chemotactic migration whereas KP-10 rather induces chemokinesis, being able to relay motility even in the presence of homogenous concentrations. It shows for the first time the difference between P2.58 receptors, mediating polarized cell migration involving adhesion to the matrix component, and a P2.59 receptor stimulating motility even in homogenous

concentrations of ligands, suggesting less controlled adhesive properties. Thus, this key aspect may constitute part of the old-age question on how receptor homogenously distributed at the plasma membrane may regulate polarization of the cells and the moving in one direction. It means that signaling molecules involved in cytoskeleton reorganization must be temporally regulated and spatially controlled. Among these proteins, those forming nascent adhesions and mature FAs were recently described as signaling hubs for chemotaxis (Case *et al*., 2015). As attended for chemotactic receptors, we measured increased adhesion of cells after 15 min incubation of cells expressing UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 (and not 30 min, *not shown*) with UII and SDF-1α, and in the case of UT, the activation of the P-paxillin and the number of FAs, and then recruitment of β1 integrins associated with a tendency to stimulate FAK. In contrast, even if Kiss1R-P2.59 also increased the number of FAs, cells did not show clear adhesion at 15 min, and neither factors involved in the formation of FAs were seen to be specifically involved, suggesting that some adhesion points can be constitutively formed to allow motility, but that Kiss1R-P.59 mainly favors traction forces.

Our preliminary experiments suggest that the directional migration evoked by UT-P2.58 required directly or indirectly $G_{\alpha 13}$ and not $G_{\alpha q}$ activation whereas cell motility resulting from the Kiss1R-P2.59 is totally dependent on $G_{\alpha q}$ protein. This original observation can be implemented by the previous data indicating that the P2.58 receptors PAR-2 and AT-1, known to be also coupled to $G_{\alpha q}$, would mediate chemotaxis independent of G_q proteins, and in the case of PAR-2, receptor-induced chemotaxis may even be antagonized by G_q (DeFea, 2007). Indeed, chemotaxis mediated by these two receptors has been shown to involve β-Arrestins (Hunton *et al*., 2005; Ge *et al*., 2004). According to this, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 were able to recruit β-Arrestin 2 and also, their endocytic/internalized behavior was shown to be regulated in two phase manner, a short-term disappearance from the cell surface, followed by a transitory return to the plasma membrane, and then a new phase of endocytosis, under continuous ligand activation at low desensitized concentrations (10^{-9} M). This is probably connected to the previous studies showing that desensitization and recycling of chemotactic receptors are essential for maintaining polarity, and that β-arrestins may serve as a scaffold for proteins involved in cytoskeleton reorganization (Caterina *et al*., 1995; Xiao *et al*., 1997). In our study, few minutes following the activation of UT-P2.58, less receptors are detected at the plasma membrane, associated with diminished number but increased size of FA, and a second transient phase then consists in recycling of UT-P2.58 (15 min) to the plasma membrane, concomitant with the increased number of FAs, and the enhancement of the nascent adhesions. In addition, in the meantime, cells likely suppress lamellipodia to allow

a majority of cells with one lamellipodia, important for cell polarization. Even if we need to perform addition experiments, we expect that the second phase of ERK1/2, previously described in the paper of Brulé *et al*. (2014) and confirmed here, is tightly connected with this transient cycle of cell adhesion allowing chemotactic migration. Accordingly, cell migration was previously shown to be governed by succession of adhesion and de-adhesion steps and a balance with this two processes is required for an optimal cell movement (Hautaniemi *et al*., 2005).

During 60 min of Kiss1R-P2.59 ligand exposure, increased number of FAs without phasic regulation of the expression of the receptor at the plasma membrane, associated with the cyclic reduction of FAs area and synthesis of nascent focal complexes, would favor chemokinesis. Also, cells exhibit more than one lamellipodia during receptor activation, suggesting that cells would be more prone to move randomly, with less efficiency in term of directionality. Together, by comparing our data on P2.58 and P.59 receptors, a dynamic wave involving connection between receptor desensitization and resensitization, increased FAs size (suggestive of maturation) and neo-formation of tight adhesions, associated with selection of the number of lamellipodia, strongly support the definition of cell chemotaxis. This synthesis has to bring closer to recent publications demonstrating that i) β-arrestin 2 facilitates recycling of δ-opioid receptor (δ-OR) after binding to low internalizing agonist potentially involving Giβγ proteins (Audet *et al*., 2012; Pradan *et al*., 2016), ii) FA turnover at the leading edge of migrating cells may involve inhibition of autophagy leading to absence of degradation of phosphorylated FA proteins (Kenific *et al*., 2016), and iii) activated ERK1/2 at the plasma membrane may facilitate binding of mcalpains to PIP2, and therefore its localization at the rear plasma membrane, being centrally involved in directional cell migration (Shao *et al*., 2006; Leloup *et al*., 2010). Considering that our recent original study established that UT-P2.58 and CXCR4-P.2.58 stimulate mcalpain activity and inhibit autophagy, to favor chemotactic migration (Coly *et al*., 2016), we proposed the following model for the number of chemotactic P2.58 GPCRs: Low desensitizing agonist of receptor likely evokes Gαi/βγ protein activation, as well as $G_{\alpha 13}$, leading to a diminished cAMP and PKA activity, as well as ERK1/2 activation, responsible for a first wave of activation important for adhesion at the leading edge and membrane ruffling, followed by binding of β-Arrestin 2, recycling of the receptor to the plasma membrane, initiation of reactivation of ERK1/2 combined with the concomitantly inhibited state of PKA, may lead to mcalpain-activation at rear or side edge of cells, may favor local FA disassembly, elimination of proximal protrusion to direct polarized migration (Fig. 9). Of course, additional mechanisms such as FAK signaling (Webb *et al*.,

2004) are also implicated in FA disassembly. The random motility stimulated by Kiss1R-P2.59, that can be related to the KP-induced morphological changes of cells previously described (Navenot *et al*., 2009), is shown to be dependent on G_q signaling cascade, likely favoring adhesion and migration. We propose that it may involve Rho A and Rac-dependent cell contraction (Katoh *et al*., 1998; Chikumi *et al*., 2002; Vogt *et al*., 2003) and migration. In the context of Rac and downstream effectors, being involved in collective behavior of multiple self-organizing waves, we hypothesize that Kiss1R-P2.59 receptors as other members of the same family, would be involved in "pushing" such endogenous dynamic.

Impact of the mutation of the proline or insertion/deletion in activation of P2.58 and P2.59 receptors

Based on the hypothetical scheme important to better understand the subtle differences between sensing a gradient and moving towards the good direction (chemotaxis), or accelerating movements in a random way (chemokinesis), we here aimed to decipher whether the P2.58 would allow a high sensitivity to changes in ligand concentration and/or accompany the cycle of desensitization/resensitization essential for directional migration. Indeed, P2.58A or P2.59A mutations, but also originally, insertion and deletion to reposition the Pro from 2.58 to 2.59 in UT and CXCR4) and P2.59 to P2.58 in Kiss1R have been conducted. These mutants were correctly folded at the plasma membrane likely allowing binding, more particularly for the ΔKiss1R-P2.58, suggesting that this proline in PEP, SO and CHEM receptors is not essential for reticulum sorting or membrane expression. It is interesting to note that P2.58 mutations into P2.59 impact while maintaining, binding of SDF-1α whereas P2.59 mutants exhibited a large increased conformational change during agonist binding. Accordingly, mutation of the Pro to Ala in the TXP motif into CCR5 decreased ligand binding and signaling (Arias *et al*., 2003) while into the AT-1, it does not result in diminish affinity for the agonist, but clear decrease in signaling transduction (Reis *et al*., 2007). This is closed to our results demonstrating that ΔUT-P2.58A/P2.59 and ΔCXCR4-P2.58A/P2.59 mutant receptors completely lost direct G_i and G_o couplings, while the affinity for the direct G_q coupling is clearly shifted but conserved, and then Gα13 activation would have been also lost, suggesting a strong importance of this proline for the $G_{i/o}$ as well as G_{13} but also G_q protein couplings. However, It is interesting to observe that IP_1 production remains to be detected for UT receptor mutants allowing Gq-dependent motile behavior. When the Pro is mutated or repositioned in ΔKiss1R-P2.59A and ΔKiss1R-P2.58, direct G_q coupling is almost abolished, a coupling that appears involved in the motile behavior of Kiss1R-P2.59. Together,

we can say that P2.58 and P2.59 positions mediate receptor activation and are important for the specific $G_{i/o}$ couplings in P2.58 receptors, or for G_q recruitment in P2.59 receptors. In addition, we also demonstrated for the first time that P2-58-induced recruitment of β-Arrestin 2 was abolished in the ΔP2.59 mutants, in the same way than for the wild-type Kiss1R-P2.59 receptor. This last aspect remains to be clarified, and also may be specific to Kiss1R since β-Arrestin 2 has been shown to be recruited by a number of G0 receptor family (Ren *et al.*, 2005).

The choice of the Kiss1R as prototype of P2.59 (PEP) and UT (SO) and CXCR4 (CHEM) as prototype of P2.58 receptors, enabled UT to have an optimal position, likely having conserved the G_q coupling for its ancestral KISS receptor family, and acquired specific $G_{i/o}$ couplings (and others, Gα13) to mediate chemotactic behavior. Thus, this is probably the reason why the ΔUT-P2.59 mutant, even if it not reproduces the behavior of the Kiss1R-P2.59 because of the key role of the Pro in TM2, at least in part mimics some Kiss1R-mediating activities. It relies on conserved G_q-mediating cell motility, loss of cell adhesion properties, and cyclic resentization of the receptor to the plasma membrane important for FA disassembly and selection of lamellipodia. Reversely, we were less successful with the ΔKiss1R-P2.58 mutant because it did not acquire a detectable $G_{\alpha i/o}$ coupling, lost Gq coupling (even if IP1 metabolism can be detected), nevertheless, exhibited tight ability to show an onset of regulated adhesion properties, with a reduced number of lamellipodia associated with ERK1/2 activation and receptor endocytosis in a G-protein independent way. This hypothesis is also supported by the works establishing that different signaling pathways can be decoupled (Liu *et al.*, 2012). At this stage, we think that it will be very important to test the potential β-Arrestin 2 acquired coupling during the kinetic of activation of the ΔKiss1R-P2.58 because previous studies demonstrated that β-Arrestin 2-deficient leucocytes were impaired in chemotaxis evoked by AT-1- and PAR-2-Gαq receptors (Hunton *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2004).

In summary, we propose that the P2.58 repositioning in Rhodopsine Class family GPCRs allow, first, a propensity to be engage with β-arrestin 2, and for low desensitized ligand concentration, to strengthen the engagement between P2.58 receptor and β-arrestin 2, at the cells membrane then encouraging receptor resensitizaton. This mechanism, again would allow sequestration for instance of ERK1/2 at the plasma membrane with other potential partners (See for review DeFea, 2007), important for localized adhesion or deadhesion and chemotaxic behavior. However, the acquisition of the $G_{i/o}$ coupling would be more complex and probably involved during evolutionary processes, over correlated mutations.

Potential receptor conformational changes leading to acquisition of the β-Arrestin 2 resensitizing phenotype of P2.58 receptors?

In the absence of any molecular modeling of the wild-type Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58 or CXCR4-P2.58 versus the insertion/deletion respective mutants, we tentatively make a proposition concerning structural aspects of the role of the proline in P2.59 or P2.58 in TM2 of G0 and G1 receptor groups (Devillé *et al*., 2009). Modeling and crystallographic studies led to the establishment that the unusual proline pattern in TM2 (P2.58, P.2.59 or P2.60) or even no proline, led to a distortion, either resulting in a bulge (P2.59) or a kink (P2.58) structure (Cherezov *et al*., 2007; Rassmussen *et al*., 2007; Warne *et al*., 2008; Wu *et al*., 2010; Devillé *et al*., 2009; Fenalti *et al*., 2014). The helical distortions may play a major role in the overall fold of GPCRs. In fact most GPCRs possess α-Bulges in TM2 and TM5 (Rey *et al*., 2010; Cartailler *et al*., 2004), probably also observable in most other GPCR helices (Van der Kant and Vriend, 2014). These bulges appear to be a prominent feature of GPCRs, and thus the presence or absence of this bulge, may be directly linked to a specific activation process. In our study, modelizing of localized proline in TM2, confirmed a bulge structure in the wild-type Kiss1R-P2.59 and the mutant ΔUT-P2.59 and ΔCXCR4-P2.59, and a kink structure of the wild-type UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 as well as the mutant ΔKiss1R-P.58 receptors, suggesting that our interpretation on the ability of P2.59 to lose a specific-β-arrestin (and also $G_{i/o}$) coupling, would be attributed to the kink structure of TM2.

Ultimately, ligand binding features (low gradient or highly desensitizing concentrations) occurring in P2.58 receptors can mediate differential signaling events and cell activities, likely resembling to biased behavior. Analysis of active and inactive crystal structures, has led to the proposal of common activation mechanisms for Rhodopsine class GPCRs which stress the central hydrophobic core (Tehan *et al*., 2014) or TM3 as a central hub in the core (Dalton *et al*., 2015). However Activation of either G protein or β-arrestin signaling pathway has been shown to result from different conformational changes of receptors, but appears to be in general, a relatively conserved mechanism between, for instance, P2.59 and P2.58 GPCRs. It is proposed that G protein coupling involves a conformational switch of two interacting side chains (Valentin-Hansen *et al*., 2012) leading to straightening of TM3, kinking of TM6 and opening of the G protein binding site at the intracellular surface of the receptor (Tautermann *et al*., 2014), whereas β-Arrestin 2 recruitment may implicate the TM1-TM2 and TM7-water network and N^{a+} binding. Comparing the crystal structure of the muscarinic receptor M2R (G0 group, Fig. 1A) and the δOR (SO, Fig. 1A), the internal water network, connecting the ligand binding site to the intracellular interface, and the Na^{+} binding site, involving the well-

known motif NPXXY motif on TM7, the WXP motif on TM6 and also importantly, the N2.50 motif on TM2, are conserved (Gutierrez-de-Teran, et al., 2013). Negative allosteric effects of Na^+ on ligand binding and stability has been already shown in α-adrenergic receptor (G0 group) (Goblyos and Ijzerman, 2010; Parker *et al.*, 2008; Magnani *et al.*, 2008). Thus, the mechanism distinguishing P2.58 from P2.59 receptors, in their specific potential propensity to be couple to β-arrestins in a certain manner, may be rather subtle variations in hydrogen bonding engaged with and surrounding N^{a+} between notably N2.50 (TM2) and S3.39 (TM3). In δOR, Na^+ is also coordinated by the non-conserved N3.35 side chain that when mutated, evoked a constitutive selective activity toward β-arrestin 2 (Fenalti *et al.*, 2014). We can propose that the polar residues (as N but also T or G) at the 3.35, conserved in opioid-, PAR1-, CXCR4- but also UT-type P2.58 receptors, may constitute a key specific feature allowing high sensitivity for ligand binding and β-arrestin 2 coupling mediating signaling events. In P2.59 or P2.60 receptors including KISS1R, we follow the previously proposed mechanism suggesting that high affinity binding and the presence of N^{a+} are indeed mutually exclusive, consistent with the observed negative allosteric effects of N^{a+} on binding of agonist of this GPCR group family (Parker *et al.*, 2008).

In conclusion, our work led to a general view on evolutionary related Rhodopsin class GPCRs resulting from deletion in TM2, splitting P2.58 (UT or CXCR4) receptors from peptide receptors (Kiss1R) which possess for some a P2.59. We propose that the kink structure of TM2 of the SO, CHEM and potentially PUR family GPCRs, favors specific competence acquisition at least residing in high ligand sensitivity, β-arrestin 2 coupling in receptor-bound state, desensitization/resensitization of receptor leading to assembly/disassembly of FA to mediate chemotactic cell migration. This specific behavior would finely introduce a break in cell signaling waves occurring during cell migration.

References

Arias, D.A., Navenot, J.-M., Zhang, W., Broach, J., Peiper, S.C., 2003. Constitutive Activation of CCR5 and CCR2 Induced by Conformational Changes in the Conserved TXP Motif in Transmembrane Helix 2. J. Biol. Chem. 278, 36513–36521. doi:10.1074/jbc.M303739200

Artemenko, Y., Lampert, T.J., Devreotes, P.N., 2014. Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes. Cell. Mol. Life Sci. 71, 3711–3747. doi:10.1007/s00018-014-1638-8

Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millecamps, M., Stone, L.S., Pineyro, G., 2012. Differential association of receptor-Gβγ complexes with β-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of δ opioid receptor agonists. J. Neurosci. 32, 4827–4840. doi:10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012

Ballesteros, J.A., Weinstein, H., 1995. [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors, in: Sealfon, S.C. (Ed.), Methods in Neurosciences, Receptor Molecular Biology. Academic Press, pp. 366–428.

Bianco, S.D.C., Vandepas, L., Correa-Medina, M., Gereben, B., Mukherjee, A., Kuohung, W., Carroll, R., Teles, M.G., Latronico, A.C., Kaiser, U.B., 2011. KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. Endocrinology 152, 1616–1626. doi:10.1210/en.2010-0903

Bjarnadóttir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., Schiöth, H.B., 2006. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. Genomics 88, 263–273. doi:10.1016/j.ygeno.2006.04.001

Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami, K., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.-P., Raz, E., 2006. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. Dev. Cell 11, 613–627. doi:10.1016/j.devcel.2006.09.023

Bravo-Cordero, J.J., Hodgson, L., Condeelis, J., 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. Curr. Opin. Cell Biol. 24, 277–283. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.004

Brulé, C., Perzo, N., Joubert, J.-E., Sainsily, X., Leduc, R., Castel, H., Prézeau, L., 2014. Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. FASEB J 28, 5148–5162. doi:10.1096/fj.14-249771

Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., Benovic, J.L., 2010. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. J. Biol. Chem. 285, 7805–7817. doi:10.1074/jbc.M109.091173

Busillo, J.M., Benovic, J.L., 2007. Regulation of CXCR4 signaling. Biochim. Biophys. Acta 1768, 952–963. doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.002

Cao, X., Yan, J., Shu, S., Brzostowski, J.A., Jin, T., 2014. Arrestins function in cAR1 GPCR-mediated signaling and cAR1 internalization in the development of Dictyostelium discoideum. Mol. Biol. Cell 25, 3210–3221. doi:10.1091/mbc.E14-03-0834

Cartailler, J.-P., Luecke, H., 2004. Structural and functional characterization of pi bulges and other short intrahelical deformations. Structure 12, 133–144.

Case, L.B., Baird, M.A., Shtengel, G., Campbell, S.L., Hess, H.F., Davidson, M.W., Waterman, C.M., 2015. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. Nat Cell Biol 17, 880–892. doi:10.1038/ncb3180

Castaño, J.P., Martínez-Fuentes, A.J., Gutiérrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M., 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? Peptides 30, 10–15. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.025

Caterina, M.J., Devreotes, P.N., Borleis, J., Hereld, D., 1995. Agonist-induced loss of ligand binding is correlated with phosphorylation of cAR1, a G protein-coupled chemoattractant receptor from Dictyostelium. J. Biol. Chem. 270, 8667–8672.

Chabbert, M., Castel, H., Pele, J., Deville, J., Legendre, R., Rodien, P., 2012. Evolution of class A G-protein-coupled receptors: implications for molecular modeling. Curr. Med. Chem. 19, 1110–1118.

Chantreau, V., Taddese, B., Munier, M., Gourdin, L., Henrion, D., Rodien, P., Chabbert, M., 2015. Molecular Insights into the Transmembrane Domain of the Thyrotropin Receptor. PLOS ONE 10, e0142250. doi:10.1371/journal.pone.0142250

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Stevens, R.C., 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science 318, 1258–1265. doi:10.1126/science.1150577

Chikumi, H., Vázquez-Prado, J., Servitja, J.-M., Miyazaki, H., Gutkind, J.S., 2002. Potent Activation of RhoA by Gαq and Gq-coupled Receptors. J. Biol. Chem. 277, 27130–27134. doi:10.1074/jbc.M204715200

Cho, S.-G., Li, D., Tan, K., Siwko, S.K., Liu, M., 2012. KiSS1 and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 31, 585–591. doi:10.1007/s10555-012-9367-7

Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., Horwitz, A.R., 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent

adhesions in a myosin II motor-independent manner. Nat. Cell Biol. 10, 1039–1050. doi:10.1038/ncb1763

Choi, C.K., Zareno, J., Digman, M.A., Gratton, E., Horwitz, A.R., 2011. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. Biophys. J. 100, 583–592. doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3719

Coly, P.-M., Perzo, N., Le Joncour, V., Lecointre, C., Schouft, M.-T., Desrues, L., Tonon, M.-C., Wurtz, O., Gandolfo, P., Castel, H., Morin, F., 2016. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. Autophagy 0. doi:10.1080/15548627.2016.1235125

Contento, R.L., Molon, B., Boularan, C., Pozzan, T., Manes, S., Marullo, S., Viola, A., 2008. CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 10101–10106. doi:10.1073/pnas.0804286105

Cvetkovic, D., Dragan, M., Leith, S.J., Mir, Z.M., Leong, H.S., Pampillo, M., Lewis, J.D., Babwah, A.V., Bhattacharya, M., 2013. KISS1R induces invasiveness of estrogen receptor-negative human mammary epithelial and breast cancer cells. Endocrinology 154, 1999–2014. doi:10.1210/en.2012-2164

Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. Nature 390, 88–91. doi:10.1038/36362

Dalton, J.A., Lans, I., Giraldo, J., 2015. Quantifying conformational changes in GPCRs: glimpse of a common functional mechanism. BMC Bioinformatics 16. doi:10.1186/s12859-015-0567-3

DeFea, K.A., 2007. Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. Annu. Rev. Physiol. 69, 535–560. doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154804

Deupi, X., Dölker, N., López-Rodríguez, M.L., Campillo, M., Ballesteros, J.A., Pardo, L., 2007. Structural models of class a G protein-coupled receptors as a tool for drug design: insights on transmembrane bundle plasticity. Curr Top Med Chem 7, 991–998.

Deupi, X., Kobilka, B.K., 2010. Energy Landscapes as a Tool to Integrate GPCR Structure, Dynamics, and Function. Physiology 25, 293–303. doi:10.1152/physiol.00002.2010

Devillé, J., Rey, J., Chabbert, M., 2009. An indel in transmembrane helix 2 helps to trace the molecular evolution of class A G-protein-coupled receptors. J. Mol. Evol. 68, 475–489. doi:10.1007/s00239-009-9214-9

Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.-P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L., Stevens, R.C., 2014. Molecular control of δ-opioid receptor signalling. Nature 506, 191–196. doi:10.1038/nature12944

Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., Schiöth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol. Pharmacol. 63, 1256–1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256

Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., Firtel, R.A., 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. Cell 109, 611–623.

Ge, L., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., DeFea, K., 2004. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. J. Biol. Chem. 279, 55419–55424. doi:10.1074/jbc.M410312200

Geiger, B., Yamada, K.M., 2011. Molecular architecture and function of matrix adhesions. Cold Spring Harb Perspect Biol 3. doi:10.1101/cshperspect.a005033

Glodek, A.M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J.J., Silberstein, L.E., 2003. Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. J. Exp. Med. 197, 461–473.

Göblyös, A., Ijzerman, A.P., 2011. Allosteric modulation of adenosine receptors. Biochim. Biophys. Acta 1808, 1309–1318. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.013

Govaerts, C., Blanpain, C., Deupi, X., Ballet, S., Ballesteros, J.A., Wodak, S.J., Vassart, G., Pardo, L., Parmentier, M., 2001. The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A structural determinant of chemokine-induced activation. J. Biol. Chem. 276, 13217–13225. doi:10.1074/jbc.M011670200

Govaerts, C., Bondue, A., Springael, J.-Y., Olivella, M., Deupi, X., Poul, E.L., Wodak, S.J., Parmentier, M., Pardo, L., Blanpain, C., 2003. Activation of CCR5 by Chemokines Involves an Aromatic Cluster between Transmembrane Helices 2 and 3. J. Biol. Chem. 278, 1892–1903. doi:10.1074/jbc.M205685200

Gradel, K.O., Nørgaard, M., Schønheyder, H.C., Dethlefsen, C., Ejlertsen, T., Kristensen, B., Nielsen, H., 2010. Salmonella or Campylobacter gastroenteritis prior to a cancer diagnosis does not aggravate the prognosis: a population-based follow-up study. APMIS 118, 136–142. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02571.x

Grieco, P., Franco, R., Bozzuto, G., Toccacieli, L., Sgambato, A., Marra, M., Zappavigna, S., Migaldi, M., Rossi, G., Striano, S., Marra, L., Gallo, L., Cittadini, A., Botti, G., Novellino, E., Molinari, A., Budillon, A., Caraglia, M., 2011. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. J. Cell. Biochem. 112, 341–353. doi:10.1002/jcb.22933

Gutiérrez-de-Terán, H., Massink, A., Rodríguez, D., Liu, W., Han, G.W., Joseph, J.S., Katritch, I., Heitman, L.H., Xia, L., Ijzerman, A.P., Cherezov, V., Katritch, V., Stevens, R.C., 2013. The role of a sodium ion binding site in the allosteric modulation of the A(2A) adenosine G protein-coupled receptor. Structure 21, 2175–2185. doi:10.1016/j.str.2013.09.020

Hautaniemi, S., Kharait, S., Iwabu, A., Wells, A., Lauffenburger, D.A., 2005. Modeling of signal-response cascades using decision tree analysis. Bioinformatics 21, 2027–2035. doi:10.1093/bioinformatics/bti285

Horuk, R., 1998. Chemokines beyond inflammation. Nature 393, 524–525. doi:10.1038/31116

Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., Jiang, H., Chen, K., 2003. Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. Biophys. J. 84, 171–184. doi:10.1016/S0006-3495(03)74840-1

Hunton, D.L., Barnes, W.G., Kim, J., Ren, X.-R., Violin, J.D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D.D., Lefkowitz, R.J., 2005. Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. Mol. Pharmacol. 67, 1229–1236. doi:10.1124/mol.104.006270

Iijima, M., Devreotes, P., 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. Cell 109, 599–610.

Insall, R.H., Soede, R.D., Schaap, P., Devreotes, P.N., 1994. Two cAMP receptors activate common signaling pathways in Dictyostelium. Mol. Biol. Cell 5, 703–711.

Jarjour, A.A., Durko, M., Luk, T.L., Marçal, N., Shekarabi, M., Kennedy, T.E., 2011. Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation. PLoS ONE 6, e25408. doi:10.1371/journal.pone.0025408

Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Prézeau, L., Castel, H., Gandolfo, P., 2010. The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. Biochem. J. 428, 113–124. doi:10.1042/BJ20090867

Ji, K., Ye, L., Mason, M.D., Jiang, W.G., 2013. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). Int. J. Mol. Med. 32, 747–754. doi:10.3892/ijmm.2013.1472

Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, I., 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. J. Biol. Chem. 273, 17299–17302.

Jiang, T., Zhang, S., Lin, B., Meng, L., Gao, H., 2005. [Expression and clinical significance of KISS-1 and GPR54 mRNA in endometrial carcinoma]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 27, 229–231.

Jin, T., Xu, X., Hereld, D., 2008. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. Cytokine 44, 1–8. doi:10.1016/j.cyto.2008.06.017

Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A., Negishi, M., 1998. Constitutively Active Gα12, Gα13, and Gαq Induce Rho-dependent Neurite Retraction through Different Signaling Pathways. J. Biol. Chem. 273, 28700–28707. doi:10.1074/jbc.273.44.28700

Kenific, C.M., Stehbens, S.J., Goldsmith, J., Leidal, A.M., Faure, N., Ye, J., Wittmann, T., Debnath, J., 2016. NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. J. Cell Biol. 212, 577–590. doi:10.1083/jcb.201503075

Kolakowski, L.F., 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. Recept. Channels 2, 1–7.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J. Biol. Chem. 276, 34631–34636. doi:10.1074/jbc.M104847200

Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X.L., Calderwood, D.A., Schlaepfer, D.D., 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. J. Cell Biol. 196, 223–232. doi:10.1083/jcb.201108078

Lecointre, C., Desrues, L., Joubert, J.E., Perzo, N., Guichet, P.-O., Le Joncour, V., Brulé, C., Chabbert, M., Leduc, R., Prézeau, L., Laquerrière, A., Proust, F., Gandolfo, P., Morin, F., Castel, H., 2015. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. Oncogene 34, 5080–5094. doi:10.1038/onc.2014.433

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. J. Natl. Cancer Inst. 88, 1731–1737.

Lee, J.-H., Welch, D.R., 1997. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. Int. J. Cancer 71, 1035–1044. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970611)71:6<1035::AID-IJC20>3.0.CO;2-B

Leloup, L., Shao, H., Bae, Y.H., Deasy, B., Stolz, D., Roy, P., Wells, A., 2010. m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to

phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. J. Biol. Chem. 285, 33549–33566. doi:10.1074/jbc.M110.123604

Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelerie, F., Lagane, B., 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. Blood 113, 6085–6093. doi:10.1182/blood-2008-12-196618

Li, Q., Roa, A., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2012. Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. Neuroendocrinology 96, 212–221. doi:10.1159/000335998

Lin, H., Sassano, M.F., Roth, B.L., Shoichet, B.K., 2013. A pharmacological organization of G protein-coupled receptors. Nat. Methods 10, 140–146. doi:10.1038/nmeth.2324

Liu, J., Zhao, Y., Sun, Y., He, B., Yang, C., Svitkina, T., Goldman, Y.E., Guo, W., 2012. Exo70 stimulates the Arp2/3 complex for lamellipodia formation and directional cell migration. Curr. Biol. 22, 1510–1515. doi:10.1016/j.cub.2012.05.055

Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M.J., Tate, C.G., 2008. Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 10744–10749. doi:10.1073/pnas.0804396105

Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernández, S., Martín de Ana, A., Jones, D.R., Torán, J.L., Martínez-A, C., 2001. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. EMBO J. 20, 2497–2507. doi:10.1093/emboj/20.10.2497

Mittal, N., Roberts, K., Pal, K., Bentolila, L.A., Fultz, E., Minasyan, A., Cahill, C., Pradhan, A., Conner, D., DeFea, K., Evans, C., Walwyn, W., 2013. Select G-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and β-arrestin 1 pathway. Cell Rep 5, 1010–1021. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.015

Miura, S., Karnik, S.S., 2002. Constitutive Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor Alters the Orientation of Transmembrane Helix-2. J. Biol. Chem. 277, 24299–24305. doi:10.1074/jbc.M202743200

Miura, S., Zhang, J., Boros, J., Karnik, S.S., 2003. TM2-TM7 Interaction in Coupling Movement of Transmembrane Helices to Activation of the Angiotensin II Type-1 Receptor. J. Biol. Chem. 278, 3720–3725. doi:10.1074/jbc.M211338200

Monterrubio, M., Mellado, M., Carrera, A.C., Rodríguez-Frade, J.M., 2009. PI3Kgamma activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 388, 199–204. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.153

Navenot, J.-M., Fujii, N., Peiper, S.C., 2009. KiSS1 Metastasis Suppressor Gene Product Induces Suppression of Tyrosine Kinase Receptor Signaling to Akt, Tumor Necrosis

Factor Family Ligand Expression, and Apoptosis. Mol Pharmacol 75, 1074–1083. doi:10.1124/mol.108.054270

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature 411, 613–617. doi:10.1038/35079135

Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, J.E., Szereszewski, J.M., Ahow, M.R., Zajac, M., Millar, R.P., Bhattacharya, M., Babwah, A.V., 2009. Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and {beta}-arrestin. Mol. Endocrinol. 23, 2060–2074. doi:10.1210/me.2009-0013

Parker, M.S., Wong, Y.Y., Parker, S.L., 2008. An ion-responsive motif in the second transmembrane segment of rhodopsin-like receptors. Amino Acids 35, 1–15. doi:10.1007/s00726-008-0637-6

Pelé, J., Abdi, H., Moreau, M., Thybert, D., Chabbert, M., 2011. Multidimensional scaling reveals the main evolutionary pathways of class A G-protein-coupled receptors. PLoS ONE 6, e19094. doi:10.1371/journal.pone.0019094

Petrie, R.J., Doyle, A.D., Yamada, K.M., 2009. Random versus directionally persistent cell migration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 538–549. doi:10.1038/nrm2729

Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell 112, 453–465.

Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A., Molon, B., 2016. CXCR4 signaling in health and disease. Immunol. Lett. 177, 6–15. doi:10.1016/j.imlet.2016.06.006

Prabhu, V.V., Sakthivel, K.M., Guruvayoorappan, C., 2013. Kisspeptins (KiSS-1): essential players in suppressing tumor metastasis. Asian Pac. J. Cancer Prev. 14, 6215–6220.

Pradhan, A.A., Perroy, J., Walwyn, W.M., Smith, M.L., Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Bana, A., Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2016. Agonist-Specific Recruitment of Arrestin Isoforms Differentially Modify Delta Opioid Receptor Function. J. Neurosci. 36, 3541–3551. doi:10.1523/JNEUROSCI.4124-15.2016

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human β2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature 450, 383–387. doi:10.1038/nature06325

Reis, R.I., Santos, E.L., Pesquero, J.B., Oliveira, L., Schanstra, J.P., Bascands, J.-L., Pecher, C., Paiva, A.C.M., Costa-Neto, C.M., 2007. Participation of transmembrane proline 82 in

angiotensin II AT1 receptor signal transduction. Regulatory Peptides 140, 32–36. doi:10.1016/j.regpep.2006.11.028

Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., Lefkowitz, R.J., 2005a. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 1448–1453. doi:10.1073/pnas.0409534102

Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., Lefkowitz, R.J., 2005b. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 1448–1453. doi:10.1073/pnas.0409534102

Rey, J., Deville, J., Chabbert, M., 2010. Structural determinants stabilizing helical distortions related to proline. J. Struct. Biol. 171, 266–276. doi:10.1016/j.jsb.2010.05.002

Richardson, B.E., Lehmann, R., 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 37–49. doi:10.1038/nrm2815

Rossowski, W.J., Cheng, B.-L., Taylor, J.E., Datta, R., Coy, D.H., 2002. Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. Eur. J. Pharmacol. 438, 159–170.

Roussos, E.T., Condeelis, J.S., Patsialou, A., 2011. Chemotaxis in cancer. Nat. Rev. Cancer 11, 573–587. doi:10.1038/nrc3078

Rubin, J.B., 2009. Chemokine Signaling in Cancer: One Hump or Two? Seminars in cancer biology 19, 116. doi:10.1016/j.semcancer.2008.10.001

Sadik, C.D., Luster, A.D., 2012. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. J. Leukoc. Biol. 91, 207–215. doi:10.1189/jlb.0811402

Segain, J.-P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Blétière, D., Loirand, G., Pacaud, P., 2007. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. J. Immunol. 179, 901–909.

Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B., Wells, A., 2006. Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. Mol. Cell. Biol. 26, 5481–5496. doi:10.1128/MCB.02243-05

Shenoy, S.K., 2014. Arrestin interaction with E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases: functional and therapeutic implications. Handb Exp Pharmacol 219, 187–203. doi:10.1007/978-3-642-41199-1_10

Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., 2011. β-arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. Trends in Pharmacological Sciences 32, 521–533. doi:10.1016/j.tips.2011.05.002

Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Mantovani, A., 1999. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. J. Leukoc. Biol. 66, 1–9.

Spinazzi, R., Albertin, G., Nico, B., Guidolin, D., Di Liddo, R., Rossi, G.P., Ribatti, D., Nussdorfer, G.G., 2006. Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. Int. J. Mol. Med. 18, 1107–1112.

Swaney, K.F., Huang, C.-H., Devreotes, P.N., 2010. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. Annu Rev Biophys 39, 265–289. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131228

Tan, W., Martin, D., Gutkind, J.S., 2006. The Gα13-Rho Signaling Axis Is Required for SDF-1-induced Migration through CXCR4. J. Biol. Chem. 281, 39542–39549. doi:10.1074/jbc.M609062200

Tautermann, C.S., 2014. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 4073–4079. doi:10.1016/j.bmcl.2014.07.009

Tehan, B.G., Bortolato, A., Blaney, F.E., Weir, M.P., Mason, J.S., 2014. Unifying family A GPCR theories of activation. Pharmacol. Ther. 143, 51–60. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.02.004

Theveneau, E., Mayor, R., 2012. Neural crest migration: interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial-mesenchymal transition, and collective cell migration. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 1, 435–445. doi:10.1002/wdev.28

Tzanidis, A., Hannan, R.D., Thomas, W.G., Onan, D., Autelitano, D.J., See, F., Kelly, D.J., Gilbert, R.E., Krum, H., 2003. Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. Circ. Res. 93, 246–253. doi:10.1161/01.RES.0000084382.64418.BC

Valentin-Hansen, L., Holst, B., Frimurer, T.M., Schwartz, T.W., 2012. PheVI:09 (Phe6.44) as a sliding microswitch in seven-transmembrane (7TM) G protein-coupled receptor activation. J. Biol. Chem. 287, 43516–43526. doi:10.1074/jbc.M112.395137

van der Horst, E., Peironcely, J.E., Ijzerman, A.P., Beukers, M.W., Lane, J.R., van Vlijmen, H.W.T., Emmerich, M.T.M., Okuno, Y., Bender, A., 2010. A novel chemogenomics analysis of G protein-coupled receptors (GPCRs) and their ligands: a potential strategy for receptor de-orphanization. BMC Bioinformatics 11, 316. doi:10.1186/1471-2105-11-316

van der Kant, R., Vriend, G., 2014a. Alpha-Bulges in G Protein-Coupled Receptors. International Journal of Molecular Sciences 15, 7841–7864. doi:10.3390/ijms15057841

van der Kant, R., Vriend, G., 2014b. Alpha-Bulges in G Protein-Coupled Receptors. Int J Mol Sci 15, 7841–7864. doi:10.3390/ijms15057841

Van Keymeulen, A., Wong, K., Knight, Z.A., Govaerts, C., Hahn, K.M., Shokat, K.M., Bourne, H.R., 2006. To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. J. Cell Biol. 174, 437–445. doi:10.1083/jcb.200604113

Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G., Offermanns, S., 2003. Receptor-dependent RhoA Activation in G12/G13-deficient Cells GENETIC EVIDENCE FOR AN INVOLVEMENT OF Gq/G11. J. Biol. Chem. 278, 28743–28749. doi:10.1074/jbc.M304570200

Wang, S.-C., Hong, J.-H., Hsueh, C., Chiang, C.-S., 2012. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. Lab. Invest. 92, 151–162. doi:10.1038/labinvest.2011.128

Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., Schertler, G.F.X., 2008. Structure of a β1-adrenergic G protein-coupled receptor. Nature 454, 486–491. doi:10.1038/nature07101

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. Nat. Cell Biol. 6, 154–161. doi:10.1038/ncb1094

Webb, D.J., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. Nat. Cell Biol. 4, E97-100. doi:10.1038/ncb0402-e97

Weiner, O.D., Marganski, W.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J., Kirschner, M.W., 2007. An actin-based wave generator organizes cell motility. PLoS Biol. 5, e221. doi:10.1371/journal.pbio.0050221

Wolfenson, H., Lavelin, I., Geiger, B., 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. Dev. Cell 24, 447–458. doi:10.1016/j.devcel.2013.02.012

Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science 330, 1066–1071. doi:10.1126/science.1194396

Xiao, Z., Zhang, N., Murphy, D.B., Devreotes, P.N., 1997. Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. J. Cell Biol. 139, 365–374.

Xiong, Y., Kabacoff, C., Franca-Koh, J., Devreotes, P.N., Robinson, D.N., Iglesias, P.A., 2010. Automated characterization of cell shape changes during amoeboid motility by skeletonization. BMC Syst Biol 4, 33. doi:10.1186/1752-0509-4-33

Xu, X., Meier-Schellersheim, M., Yan, J., Jin, T., 2007. Locally controlled inhibitory mechanisms are involved in eukaryotic GPCR-mediated chemosensing. J. Cell Biol. 178, 141–153. doi:10.1083/jcb.200611096

Zlotnik, A., 2008. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. J. Pathol. 215, 211–213. doi:10.1002/path.2350

Acknowledgements

We grateful the PRIMACEN platform (University of Rouen, France) for imaging equipments and the member of the Arpège platform led by L. Prézeau (IGF Montpellier, France). This work was supported ANR, Inserm, University Rouen Normandie, Normandie Région, Institute on Innovative and Biomedical Research (IRIB), J.E.J., P.M.C, C.L., A.M. were recipients of a fellowship from the Haute-Normandy or French ministry.

Financial disclosure

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interests to disclose.

Table 1: Oligonucleotides and enzymes used for subcloning of Kiss1R-P2.59 and ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 mutants.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
Kiss1R^{Myc}-P2.59	pCMV-Myc	*forward*: ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGCTCGAGTCAGAGAGGGGCGTTGTCCT	EcoRI/XhoI
Kiss1RST-P2.59	ST-pRK5	*forward*: ATCGGATATCATGCACACCGTGGCTACGTCCGG *reverse*: ATGCTCTAGAATCAGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRV/XbaI
Kiss1R^{eGFP}-P2.59	pEGFP-N2	*forward*: ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGGGATCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRI/BamHI
Kiss1R^{eYFP}-P2.59	pEYFP-N1	*forward*: ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCC	EcoRI/BamHI
ΔKiss1RST-P2.58	ST-pRK5	*forward*: ATCGGATATCATGCACACCGTGGCTACGTCCGG *reverse*: ATGCTCTAGAATCAGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRV/XbaI
ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58	pEGFP-N2	*forward* : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGGGATCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRI/BamHI
ΔKiss1R^{eYFP}-P2.58	pEYFP-N1	*forward*: ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCC	EcoRI/BamHI
ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A	pCMV-Myc	*forward*: ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGCTCGAGTCAGAGAGGGGCGTTGTCCT	EcoRI/XhoI
ΔKiss1RST-P2.59A	ST-pRK5	*forward*: ATCGGATATCATGCACACCGTGGCTACGTCCGG *reverse*: ATGCTCTAGAATCAGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRV/XbaI
ΔKiss1R^{eGFP}-P2.59A	pEGFP-N2	*forward* : ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGGGATCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCCC	EcoRI/BamHI
ΔKiss1R^{eYFP}-P2.59A	pEYFP-N1	*forward*: ATCGGAATTCATGCACACCGTGGCTACGTCC *reverse*: ATCGGGATCCCCGAGAGGGGCGTTGTCCTCC	EcoRI/BamHI

Table 2: Oligonucleotides and enzymes used for subcloning of UT-P2.58 and ΔUT-P2.58A or ΔUT-P2.59 mutants.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
UT^{Myc}-P2.58	pCMV-Myc	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: AAACTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	EcoRI/XhoI
UTST-P2.58	ST-pRK5	*forward*: ATGCACGCGTATGGCGCTGACCCCCGAGTCCC *reverse*: ATGCTCTAGAATCACGCCGGGGCCCTGGGACC	MluI/XbaI
UT^{eGFP}-P2.58	pEGFP-N2	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: ATCGGGATCCCCGCCGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
UT^{eYFP}-P2.58	pEYFP-N1	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: ATCGGGATCCCCCGCCGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
ΔUTST-P2.59	ST-pRK5	*forward*: ATGCACGCGTATGGCGCTGACCCCCGAGTCCC *reverse*: ATGCTCTAGAATCACGCCGGGGCCCTGGGACC	MluI/XbaI
ΔUT^{eGFP}-P2.59	pEGFP-N2	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: ATCGGGATCCCCGCCGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
ΔUT^{eYFP}-P2.59	pEYFP-N1	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: ATCGGGATCCCCCGCCGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/XhoI
ΔUT^{Myc}-P2.58A	pCMV-Myc	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: AAACTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	EcoRI/XhoI
ΔUTST-P2.58A	ST-pRK5	*forward*: ATGCACGCGTATGGCGCTGACCCCCGAGTCCC *reverse*: ATGCTCTAGAATCACGCCGGGGCCCTGGGACC	MluI/XbaI
ΔUT^{eGFP}-P2.58A	pEGFP-N2	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: ATCGGGATCCCCGCCGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI
ΔUT^{eYFP}-P2.58A	pEYFP-N1	*forward*: ATGCGAATTCGGATGGCGCTCACCCCCGAGT *reverse*: ATCGGGATCCCCCGCCGGGGCCCTGGGACC	EcoRI/BamHI

Table 3: Oligonucleotides and enzymes used for subcloning of CXCR4-P2.58 and CXCR4-P2.58A or ΔCXCR4-P2.59 mutants.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
CXCR4^{Myc}-P2.58	pCMV-Myc	*forward*: ATCGGAATTCCATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGCTCGAGTTAGCTGGAGTGAAAACTTGAAGAC	EcoRI/XhoI
CXCR4ST-P2.58	ST-pRK5	*forward*: ATGCACGCGTATGGAGGGGATCAGTATATACAC *reverse*: ATGCTCTAGAATTAGCTGGAGTGAAAACTTGAAGA	MluI/XbaI
CXCR4^{eGFP}-P2.58	pEGFP-N2	*forward*: ATCGGAATTCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAA	EcoRI/KpnI
CXCR4^{eYFP}-P2.58	pEYFP-N1	*forward*: ATCGGAATTCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGGGTACCCCGCTGGAGTGAAAACTTGAAGACTC	EcoRI/KpnI
ΔCXCR4ST-P2.59	ST-pRK5	*forward*: ATGCACGCGTATGGAGGGGATCAGTATATACAC *reverse*: ATGCTCTAGAATTAGCTGGAGTGAAAACTTGAAGA	MluI/XbaI
ΔCXCR4^{eGFP}-P2.59	pEGFP-N2	*forward*: ATCGGAATTCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAA	EcoRI/KpnI
ΔCXCR4^{eYFP}-P2.59	pEYFP-N1	*forward*: ATCGGAATTCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGGGTACCCCGCTGGAGTGAAAACTTGAAGACTC	EcoRI/KpnI
ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A	pCMV-Myc	*forward*: ATCGGAATTCCATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGCTCGAGTTAGCTGGAGTGAAAACTTGAAGAC	EcoRI/XhoI
ΔCXCR4ST-P2.58A	ST-pRK5	*forward*: ATGCACGCGTATGGAGGGGATCAGTATATACAC *reverse*: ATGCTCTAGAATTAGCTGGAGTGAAAACTTGAAGA	MluI/XbaI
ΔCXCR4^{eGFP}-P2.58A	pEGFP-N2	*forward*: ATCGGAATTCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGGGTACCCGCTGGAGTGAAA	EcoRI/KpnI
ΔCXCR4^{eYFP}-P2.58A	pEYFP-N1	*forward*: ATCGGAATTCTTATGGAGGGGATCAGTATATACACTT *reverse*: ATCGGGTACCCCGCTGGAGTGAAAACTTGAAGACTC	EcoRI/KpnI

Table 4: Antibodies used for cell-based ELISA assay.

primary antibody	reference	secondary antibody	reference
c-Myc antibody	Santa cruz (sc-40)	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2005)
FAK antibody	Santa cruz (sc-558)	goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2004)
p-FAK antibody (Tyr576/577)	Santa cruz (sc-21831)	rabbit anti-goat IgG-HRP	Santa cruz (sc-2768)
anti-Paxillin antibody	Millipore (05-417)	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2005)
anti-Paxillin (phospho Y31)	Abcam (ab32115)	goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2004)
anti-integrin β1 antibody	Millipore (MAB1981)	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2005)

Table 5. Summary of log pEC_{50} and maximum effects of KP-10, UII and SDF-1α in signaling pathways and cellular

		Kiss1R			UT			CXCR4		
		Kiss1R-P2.59	ΔKiss1R-P2.59A	ΔKiss1R-P2.58	UT-P2.58	ΔUT-P2.58A	ΔUT-P2.59	CXCR4-P2.58	ΔCXCR4-P2.58A	ΔCXCR4-P2.59
Receptor cell expression	Total	297,0 ± 120,5	263,8 ± 79,4	418,2 ± 108,4	643,9 ± 11,5	562,5 ± 24,7	512,1 ± 27,0	600,0 ± 180,3	542,8 ± 164,5	302,2 ± 94,3
	Cell surface	251,9 ± 13,3	272,5 ± 11,8	430,4 ± 14,3	567,9 ± 29,3	363,0 ± 19,4	329,0 ± 40,1	367,2 ± 105,7	276,8 ± 82,8	201,4 ± 60,9
Receptor ligand binding	Expression	678,8 ± 25,0	3158,2 ± 98,6	4660,0 ± 242,9	_	_	_	4002,0 ± 155,8	809,1 ± 29,5	1077,0 ± 39,9
	B_{max}	nd	20,2 ± 4,0	29,5 ± 2,7	_	_	_	31,4 ± 3,2	12,6 ± 0,5	nd
	K_d	nd	29,0 ± 7,1	47,7 ± 7,0	_	_	_	38,9 ± 6,9	5,0 ± 0,7	nd
Gq coupling	pEC_{50} (n=3)	-8,17 ± 0,14	nd	nd	-9,74 ± 0,14	nd	nd	_	_	_
	control	_	_	_	_	_	_	282,4 ± 9,1	252,2 ± 24,5	268,0 ± 17,7
	maximal effect	_	_	_	_	_	_	283,2 ± 6,5	257,6 ± 25,1	272,6 ± 14,5
IP_1 metabolism	pEC_{50} (n=3)	-9,58 ± 0,15	-7,13 ± 0,20	-7,25 ± 0,22	-9,84 ± 0,20	-9,58 ± 0,20	-7,98 ± 0,42	nd	nd	nd
Calcium mobilization	pEC_{50} (n=3)	-7,78 ± 0,13	nd	nd	-8,67 ± 0,16	nd	nd	_	_	_
	control	_	_	_	_	_	_	100,0 ± 1,23	100,0 ± 1,07	100,0 ± 1,97
	maximal effect	_	_	_	_	_	_	87,97 ± 0,73	88,91 ± 0,05	95,64 ± 0,07
Gi coupling	pEC_{50} (n=3)	_	_	_	-9,03 ± 0,38	nd	nd	-9,20 ± 0,13	-9,81 ± 0,53	nd
	control	412,2 ± 32,0	443,7 ± 48,3	446,8 ± 44,6	_	_	_	_	_	_
	maximal effect	392,9 ± 30,5	465,9 ± 44,2	447,8 ± 35,4	_	_	_	_	_	_
Go coupling	pEC_{50} (n=3)	_	_	_	-9,68 ± 0,24	nd	-8,39 ± 1,35	-9,52 ± 0,52	-12,1 ± 6,23	nd
	control	310,1 ± 17,3	335,8 ± 14,0	337,00 ± 21,7	_	_	_	_	_	_
	maximal effect	300,5 ± 22,2	339,5 ± 12,1	347,5 ± 23,0	_	_	_	_	_	_
Chemotaxis	control (n=3)	100,0 ± 7,9	100,0 ± 12,0	100,0 ± 5,71	100,0 ± 10,8	100,0 ± 10,1	100,0 ± 9,2	100,0 ± 11,9	100,0 ± 9,2	100,0 ± 12,8
	treated (n=3)	179,1 ± 14,7	123,5 ± 14,7	113,9 ± 11,4	359,0 ± 53,2	338,5 ± 56,5	475,1 ± 27,7	321,3 ± 43,0	414,8 ± 85,8	335,9 ± 76,3
	pEC_{50} (n=1)	-9,12 ± 0,16	_	nd	-10,41 ± 0,58	_	-9,49 ± 0,3	-8,12 ± 0,4	_	-8,36 ± 0,1
Chemokinesis	situation 1	100,0 ± 11,0	_	100,0 ± 51,6	100,0 ± 14,1	_	100,0 ± 26,3	100,0 ± 19,6	_	100,0 ± 12,6
	situation 2	441,7 ± 42,8	_	137,7 ± 41,8	290,7 ± 20,0	_	445,7 ± 62,8	800,0 ± 272,8	_	219,0 ± 66,5
	situation 3	420,5 ± 40,6	_	60,5 ± 5,1	130,3 ± 23,4	_	448,7± 50,0	327,8 ± 161,1	_	130,4 ± 32,8

Legend to Figures

Figure 1: Schematic representation of the different GPCR group families, the TM2 structure and the strategy for proline mutation or insertion/deletion. (A) (*upper panel*) Sequence alignment of TM2 of Kiss1R-P2.59, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 receptors following the sequence numbering system of Ballesteros and Weinstein. The most conserved residue of TM2 (aspartate (D) highlighted in orange) is assigned number 50. Proline residues of wild-type UT and CXCR4 (red) are in position 58 whereas proline of Kiss1R is in position 59. (*lower panel*) Schematic representation of PEP (purple, G0 group), SO (blue), CHEM (green) and PUR (brown) clusters (all from G1 group) phylogenetic families. Each receptor constituting those clusters are indicated, as well as percentage of the receptors presenting proline in P2.58, P2.59, P2.60 or no proline (NoP). Representative receptors, *i.e.* Kiss1R, UT and CXCR4 from PEP, SO and CHEM, respectively are indicated in the corresponding color. (B) Cartoon view of CXCR4 (P2.58, *left panel*) and OX2 (P2.59, *right panel*) receptors From Chabbert et al. (*unpublished data*). TM2 is slate. The TM2 proline (green) and the preceding oxygens (red) are shown as spheres. In CXCR4, P2.58 is close to the carbonyl groups at positions -3 and -4 (proline kink). In OX2, P2.59 is close to the carbonyl groups at positions -4 and -5 (bulge). (C) Three-dimensional structure by nuclear magnetic resonance and modelization (From Milazzo et al., *unpublished*) and sequences of Kiss1R-P2.59, UT-P2.58 and CXCR4-P2.58 receptor ligands. Kiss1R-P2.59 receptor may bind Kisspeptins of 54- (KP-54) or 10 (KP-10) amino acids. Urotensin II (UII), the endogenous ligand of UT-P2.58 is an 11-amino acid peptide with a disulfide bridge between cysteine 5 and 10. Stromal-derived Factor-1α (SDF-1α), a 89-residue peptide with 2 disulfide bridges, binds CXCR4-P2.58 receptors. Disulfide bridges are highlighted in black. (D) *(left panel)* Sequence alignment of TM2 in wild-type and mutant receptors. Proline residues are in red. Proline in position P2.59 of ΔKiss1R-P2.59A receptor was substituted by an alanine (A). Proline in position P2.58 of ΔUT-P2.58A and ΔCXCR4-P2.58A receptors was replaced by an alanine (A). A deletion of the residue C2.56 occurred in ΔKiss1R-P2.58 receptor. In the contrary, an alanine was inserted between the residues in position 55 and 56 in ΔUT-P2.59 and ΔCXCR4-P2.59 receptors. (*right panel*) TM2 helix modeling of Kiss1R-P2.59 (light purple), UT-P2.58 (light blue), CXCR4-P2.58 (light green) receptors and their respective mutants, ΔKiss1R-P2.58 (dark purple), ΔUT-P2.59 (dark blue) and ΔCXCR4-P2.59 (dark green). According to the position of the proline P2.58 or P2.59, structure of the helix present a kink or a bulge.

Figure 2: Membrane expression and binding of wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptors. (A) Schematic representation depicting ligand binding and wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptor trafficking to the plasma membrane. (B) The expression of Kiss1R-P2.59, UT-P2.58, CXCR4-P2.58 and their respective mutants on total cell (permeabilized) or at the cell surface (non-permeabilized) was assessed by ELISA, 48 hours after transfection. HEK293 cells were transiently transfected with cDNA encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A, or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, (*left panel*), pCMV-Myc (Mock), UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A, ΔUT^{Myc}-P2.59, (*middle panel*), and pCMV-Myc (Mock), CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A, ΔCXCR4^{Myc}-P2.59, (*right panel*). The wild-type and mutant receptors were significantly expressed at the plasma membrane and showed almost similar expression than wild-type corresponding receptors. Bioluminescence data are normalized to mock values. Bar graph represents mean ± SEM obtained from 3 independent experiments. (C) (*left panel*) Histograms represent the fluorescence corresponding to Tb-labeled cell surface receptors on snap-tagged (ST)-Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 or empty vector (Mock) transiently transfected in HEK293 cells. For each panel, data are mean ± SEM from 3 independent experiments. Saturation binding experiments of KP-10-red was monitored by HTRF. (*right panel*) Histograms represent the fluorescence corresponding to Tb-labeled cell surface receptors on snap-tagged (ST) CXCR4-P2.58, ΔCXCR4-P2.58A or ΔCXCR4-P2.59 or empty vector (Mock) transiently transfected in HEK293 cells. Saturation binding experiments of SDF-1α-red was monitored by HTRF. For each panel, data are mean ± SEM from 3 independent experiments.

Figure 3: Direct couplings of wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptors. (A) Schematic representation depicting the BRET strategy to measure the potential receptor G protein couplings. (B) (*upper panel*) G_q coupling was investigated by BRET between $G_{\alpha q}^{Venus}$ and γ_2^{RLuc8}, in HEK293 co-expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, (*left*), UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*), in combination with $G\alpha_q^{Venus}$, β_2^{Flag} and γ_2^{Rluc8} protein subunits in the presence of increasing concentrations of the appropriate ligands KP-10 or UII. No significant decreasing BRET signal was detected between $G_{\alpha q}^{Venus}$ and γ_2^{RLuc8} in HEK293 expressing CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 receptors in the absence or presence of SDF-1α (10^{-7} M) (*right*). Data are mean ± SEM from 3 independent experiments. (*middle panel*) IP_1 production mediated by increasing concentrations of KP-10, and UII and SDF-1α (10-7 M) ligands in HEK293 cells

expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58 (*left*), UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*), CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 (*right*). Data are mean ± SEM from 3 independent experiments. (*lower panel*) Ca^{2+} responses induced by various concentrations of KP-10 (*left*) or UII (*middle*) was monitored in HEK293 cells expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58 (*left*) and UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*). Data are expressed as the mean percentage of the maximal response induced by receptors. Mean ± SEM from 3 independent experiments. No significant Ca^{2+} increase was detected in HEK293 expressing CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 receptors in the absence or presence of SDF-1α (10^{-7} M) (*right*). Data are mean ± SEM from 1 or 2 independent experiments. (C) G_i and G_0 couplings were investigated by BRET signal between $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$ and γ_2^{Venus}, or $G\alpha_{oa}^{Rluc8}$ and γ_2^{Venus} in HEK293 co-expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, (*left*), UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*), CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 (*right*) in combination with $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$, β_2^{Flag} and γ_2^{Venus} (*upper panel*) or $G\alpha_{oa}^{Rluc8}$, β_2^{Flag} and γ_2^{Venus} (*lower panel*) protein subunits. No significant reduction of BRET signal was detected between $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$ and γ_2^{Venus}, or $G\alpha_{oa}^{Rluc8}$ and γ_2^{Venus} in HEK293 expressing Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58 receptors in the absence or the presence of KP-10 (10^{-7} M). In HEK293 co-expressing UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*) and CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 (*right*), BRET signal between $G\alpha_{i1}^{Rluc8}$ and γ_2^{Venus}, or $G\alpha_{oa}^{Rluc8}$ and γ_2^{Venus} was monitored in the presence of increasing concentrations of UII or SDF-1α. Data are mean ± SEM from 3 independent experiments.

Figure 4: Chemotactic or chemokinetic migration of cells expressing wild-type or mutant Kiss1R, UT and CXCR4 receptors. (A) Schematic representation depicting potential involvement of G_q or G_{13} in wild-type and mutant of Kiss1R, UT and CXCR4 receptor-induced migration. siRNA ($G_{\alpha13}$) or inhibitor (UBO-QIC) strategies used in those experiments are also represented. (B) HEK293 transiently transfected with cDNA encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, (*left*), UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*), CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 (*right*) were loaded in the upper chamber of modified Boyden chamber (transwell), and the appropriate KP-10, UII or SDF-1α ligands (10^{-9} M, each) were added in the lower chamber for 24 h. Microphotographs show cells that migrated onto the

lower surface of the transwell membrane under control or treated conditions (*upper panel*). Cell motility was evaluated by counting cells in 10 random fields after hematoxylin counterstaining. Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with untreated cells (control). Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from 3 representative experiments. One-way analysis of variance, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; ns, not significant; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (*lower panel*). (C) HEK293 transiently transfected with cDNA encoding Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A or ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, (*left*), UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*middle*), CXCR4^{Myc}-P2.58, ΔCXCR4^{Myc}-P2.58A or ΔCXCR4^{Myc}-P2.59 (*right*) were exposed to increasing concentrations of the appropriate KP-10, UII or SDF-1α ligands in the lower chamber of Transwell for 24 h. Graphs represent mean ± SEM obtained from 1 representative experiment in triplicate. (D) Control siRNA and siRNA directed against human $G_{\alpha 13}$ (si-G_{13}) were co-transfected into HEK293 with plasmid encoding Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, UT^{Myc}-P2.58 or ΔUT^{Myc}-P2.59. Twenty four hours after transfection, cells were added onto Transwells and treated in the absence or presence of KP-10 or UII (10^{-9} M, 24 h). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from 1 representative experiment in triplicate. (E) HEK293 cells were transiently transfected with plasmid encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R^{Myc}-P2.59, ΔKiss1R^{Myc}-P2.59A, ΔKiss1R^{Myc}-P2.58, UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59. Twenty four hours after transfection, cells were loaded in the upper chamber of the transwell in the absence or the presence of the G_q inhibitor UBO QIC (10^{-6} M) and treated in the absence or the presence of KP-10 or UII (10^{-9} M, 24 h). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from 3 experiments in triplicate. One-way analysis of variance, followed by Sidak post-test; ***P<0.001. (F) HEK293 expressing Kiss1R-P2.59 or ΔKiss1R-P2.58 (*left*), UT-P2.58, or ΔUT-P2.59 (*middle*), and CXCR4-P2.58 or ΔCXCR4-P2.59 (*right*) were loaded in the upper chamber of transwell exposed without (1) or with the appropriate KP-10, UII or SDF-1α ligands (10^{-9} M each; 24 h) in the lower chamber of the transwell (2) or in both upper and lower chambers (3). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from 2 experiments in triplicate.

Figure 5: Wild-type and mutant Kiss1R, UT and CXCR4-induced cell adhesion and focal adhesion formation. (A) Adhesion on fibronectin of HEK293 cells transfected with

pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 (*left*), UT-P2.58, ΔUT-P2.58A or ΔUT-P2.59 (*middle*), and CXCR4-P2.58, ΔCXCR4-P2.58A or ΔCXCR4-P2.59 in the absence or the presence of appropriate KP-10, UII or SDF-1α ligands (10^{-9} M each; 30 min). Bar graph represents mean ± SEM obtained from 2 to 3 experiments. (B) Paxillin activation following the application of KP-10, UII or KP-10 (10^{-9} M) on pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 (*left*) and UT-P2.58, ΔUT-P2.58A or ΔUT-P2.59 (*right*) expressing cells was assessed by ELISA, 48 hours after transfection. Cells were treated with the appropriate ligands for 30 or 60 minutes. Activation of paxillin was evaluated by measuring the ratio of bioluminescence after anti-phospho-paxillin (P-paxillin, Tyr31) and anti-paxillin antibodies in non permeabilized cells. Results are expressed as percentage of control in the absence of ligand. Bar graph represents mean ± SEM obtained from one to 3 experiments in quadruplicate. (C) Immunofluorescence analysis of the number of focal adhesion (FA) points labeled with an antibody directed against paxillin (red) in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58 (green, *upper panel*) and UT^{eGFP}-P2.58 or ΔUT^{eGFP}-P2.59 (green, *lower panel*), in the absence or the presence of KP-10 or UII (10^{-9} M; 30 min). Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (green, red and yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 20 µm. (D) Scatter plots represent the quantification of focal adhesion points per cell area in control condition in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58 in the absence or presence of KP-10 (10^{-9} M, 15 and 30 min) (*upper panel*), or in HEK293 cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 or ΔUT^{eGFP}-P2.59 in the absence or the presence of UII (10^{-9} M, 15 and 30 min) (*middle panel*) or in HEK293 cells expressing receptors with proline in position 2.58 (*lower panel, left side*) or in position 2.58 (*lower panel*, *right side*). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; ns, not significant; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (E) FAK activation following the application of KP-10 or UII on Kiss1R-P2.59 or UT-P2.58 and their respective mutants on permeabilized cell was assessed by ELISA 48 hours after transfection. HEK293 cells were transiently transfected with cDNA encoding pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 (*left*), UT-P2.58, ΔUT-P2.58A or ΔUT-P2.59 (*right*). Cells were treated with KP-10 or UII (10^{-9} M) for 30 or 60 minutes. Activation of FAK was evaluated by measuring the ratio of bioluminescence after anti-phospho-FAK (P-FAK, Tyr576/577) and anti-FAK antibodies. Results are expressed as percentage of control in the absence of KP-10 or UII. Bar graph represents mean ± SEM obtained from one representative experiment in quadruplicate. (F) The expression of β1-integrin on HEK293 cells transfected with cDNA

encoding c-Myc-tagged pCMV-Myc (Mock), Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 (*left*) and UT-P2.58, ΔUT-P2.58A or ΔUT-P2.59 receptors (*right*) was assessed by ELISA, 48 hours after transfection. Cells were treated with the appropriate KP-10 or UII ligands (10^{-9} M, each) for 30 or 60 minutes. The expression of β1-integrin was evaluated by measuring the ratio of bioluminescence after anti-β1-integrin and anti-c-Myc antibodies in permeabilized and non permeabilized cells, respectively. Results are expressed as percentage of control in the absence of ligand. Bar graph represents mean ± SEM obtained from one to 3 experiments in quadruplicate.

Figure 6: Dynamic wave of focal adhesion formation and UT-P2.58 or ΔUT-P2.59 receptor trafficking. (A) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (red) in HEK293 cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 or ΔUT^{eGFP}-P2.59 (green) in the absence or presence of UII administered for 5 to 60 min. Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 40 µm. White squares on the pictures illustrates the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Scale bars indicate 15 µm. (B and C) Quantification of FA points per cell (B) and distribution of FA areas (C) in HEK293 cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 or ΔUT^{eGFP}-P2.59 in the absence or presence of UII (10^{-9} M) administered for 5 to 60 min. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (B) FA areas are measured using a successive image treatments, and the proportion of FA comprised between 0 to 0.1 µm² (white), 0.1 to 0.2 µm² (light grey), 0.2 to 1 µm² (dark grey) and higher than 1 µm² (black) were quantified and represented for each time treatment. (D) Percentages of cells presenting a receptor membrane labeling (white), membrane and intracellular labelings (grey) or exclusively intracellular labeling (black) were quantified. (E) The interaction between receptor and β-Arrestin 2 was investigated on HEK293 cells transfected with plasmid encoding eYFP-tagged UT-P2.58, ΔUT-P2.58A or ΔUT-P2.59 receptor in combination with cDNA encoding β-Arrestin 2^{Rluc8}. BRET signal between eYFP-tagged receptors and β-Arrestin 2^{Rluc8} was monitored in the presence of increasing concentrations of UII. Data are mean ± SEM from 3 independent experiments.

Figure 7: Dynamic wave of focal adhesion formation and Kiss1R-P2.59 or ΔKiss1R-P2.58 receptor trafficking. (A) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (red) in HEK293 cells expressing

Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58 (green) in the absence or the presence of KP-10 administered for 5 to 60 min. Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 40 µm. White squares on the pictures illustrates the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Scale bars indicate 15 µm. (B and C) Quantification of FA points per cell (B) and distribution of FA areas (C) in HEK293 cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 or ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58 in the absence or the presence of KP-10 (10^{-9} M) administered for 5 to 60 min. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (B) FA areas are measured using a successive image treatments, and the proportion of FA comprised between 0 to 0.1 µm² (white), 0.1 to 0.2 µm² (light grey), 0.2 to 1 µm² (dark grey) and higher than 1 µm² (black) were quantified for each time treatment. (D) Percentages of cells presenting a receptor membrane labeling (white), membrane and intracellular labelings (grey) or exclusively intracellular labeling (black) were quantified. (E) The interaction between receptor and β-Arrestin 2 was investigated on HEK293 cells transfected with plasmid encoding eYFP-tagged Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 receptor in combination with cDNA encoding β-Arrestin 2^{Rluc8}. No significant BRET signal was detected between eYFP-tagged Kiss1R-P2.59, ΔKiss1R-P2.59A or ΔKiss1R-P2.58 receptors and β-Arrestin 2^{Rluc8} in the absence or the presence of KP-10 (10^{-7} M). Data are mean ± SEM from 3 independent experiments.

Figure 8: Effects of UT and Kiss1R wild-type and mutant receptors on the lamellipodia formation. (A) Images of representative cells transfected with cDNAs encoding UT^{eGFP}-P2.58 (*left images*) or ΔUT^{eGFP}-P2.59 (*right images*) in the absence (*upper images*) or the presence (*lower images*) of UII (15 min, 10^{-9} M). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bare correspond to 20 µm. (B) Percentage of cells expressing UT^{eGFP}-P2.58 (*upper*) or ΔUT^{eGFP}-P2.59 (*lower*) presenting membrane labeling (grey bars), no lamellipodium (●), one lamellipodium (■) or more (▲), after exposure to UII (10^{-9} M) for 5 to 60 min. (C) Images of representative cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 (*left images*) or ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58 (*right images*), in the absence (*upper images*) or the presence (*lower images*) of KP-10 (15 min, 10^{-9} M). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars correspond to 20 µm. (D) Percentage of cells expressing Kiss1R^{eGFP}-P2.59 (*upper*) or ΔKiss1R^{eGFP}-P2.58 (*lower)* presenting membrane labeling (grey bars), no lamellipodium (●), one lamellipodium (■) or more (▲), after exposure to KP-10 (10^{-9} M) for 5 to 60 min.

Supplementary information

Supplementary methods

Calcium measurement

For G_q coupling study, HEK293 cells (2 millions) were transfected with 3 µg plasmid encoding UT^{Myc}-P2.58 using Cell line nucleofector kit V as previously described. Transfected cells were then seeded in poly-L-ornithine-coated 96-well plates at a density of 50,000 cells/wells and incubated for 48h at 37°C with 5% CO_2. After incubation with 2 µM Fluo4-AM dye containing 20 % pluronic acid (1 h), cells were preincubated in the absence or presence of the G_q inhibitor UBO QIC (10^{-6} M, 30 min) and the effect of graded concentrations of UII in the absence or the presence of the G_q inhibitor UBO QIC (10^{-6} M) on $[Ca^{2+}]_c$ was measured with the FlexStation III on PRIMACEN Platform. For experiments using siRNA control and siRNA directed against RhoGEFp63 (Dharmacon, GE Healthcare Europe), HEK293 cells (2 millions) were transfected with 200 pM siRNA using Cell line nucleofector kit V. Then, 48 hours later, cells (2.5 millions) were transfected by nucleofection with 3 µg plasmid encoding $Kiss1R^{Myc}$-P2.59 or UT^{Myc}-P2.58 and 200 pM siRNA. The following day, after incubation with Fluo4-AM dye, the effect of graded concentrations of KP-10 or UII on $[Ca^{2+}]_c$ was measured with the FlexStation III on PRIMACEN Platform.

Migration assays

HEK293 cells were transfected with 4 µg empty pCMV-Myc or plasmid encoding c-Myc-tagged wild-type and mutant receptors using FuGene HD as previously described. Twenty four hours after transfection, cells were seeded at a density of 100,000 cells/125 µL/filter on the upper chamber of the Transwell. The gradient was generated by filling the lower chamber with the appropriate ligand. Cells were preincubated with PTX (6 h, 2×10^{-6} M) and PTX was added to both upper and lower chambers.

SDS-PAGE and western blot

Cells lysates were prepared in ice-cold RIPA Buffer (25 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails. Lysates were mixed with Laemmli buffer 5X (4:1, vol:vol) and loaded onto 10% SDS-PAGE gel. After separation, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore). Membrane were blocked with 5% non-fat milk, incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (anti-phospho-ERK1/2, Santa Cruz Biotechnology, sc-7383; anti-ERK1/2, Santa Cruz Biotechnology, sc-94)

and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) or against rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004) at room temperature for 1 hour. Immunoreactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence western blotting substrate (GE Healthcare).

Legends to supplementary figures

Figure S1. Kiss1r or UT Receptor Gq coupling and intracellular calcium increase. (A) Effect of G_q inhibitor UBO QIC (10^{-6} M) on UII-induced calcium mobilization on HEK293 cells expressing UT^{Myc}-P2.58. Data are expressed as percentages of the maximal response induced by UT-P2.58 without inhibitor and correspond to one representative experiment. (B) Effects of siRNA control (*light grey*) or siRNA directed against RhoGEFp63 (*dark grey*) on calcium mobilization relayed by $Kiss1R^{Myc}$-P2.59 (*left*) or UT^{Myc}-P2.58 (*right*). Data are expressed as percentages of the maximal response induced by Kiss1R-P2.59 (*left*) or UT-P2.58 (*right*) in the absence of siRNA and correspond to one representative experiment.

Figure S2. Effect of the $G_{i/o}$ coupling in wild-type and mutant Kiss1R and UT receptor-induced migration. HEK293 cells were transiently transfected with plasmid encoding pCMV-Myc (Mock), $Kiss1R^{Myc}$-P2.59, $\Delta Kiss1R^{Myc}$-P2.59A or $\Delta Kiss1R^{Myc}$-P2.58 (A) or UT^{Myc}-P2.58, ΔUT^{Myc}-P2.58A or ΔUT^{Myc}-P2.59 (B). Twenty four hours after transfection, cells were pre-treated with PTX (6h, 2×10^{-6} M), loaded in the upper chamber of the transwell in the presence or the absence of PTX (2×10^{-6} M), and treated in the absence or the presence of KP-10 (A) or UII (10^{-9} M, 24 h; B). Histograms are quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared with control. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from one (A) or 3 (B) experiments in triplicate. One-way analysis of variance, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; **P<0.01.

Figure S3. Wild-type and mutant CXCR4-mediated adhesion and CXCR4-P2.58 receptor trafficking. (A) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (*red*) in HEK293 cells expressing $CXCR4^{eGFP}$-P2.58 or $\Delta CXCR4^{eGFP}$-P2.59 (*green*), in the absence or presence of SDF-1α (10^{-9} M; 30 min). Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 20 µm. (B) Scatter plots represent the quantification of focal adhesion points per cell area in control condition in HEK293 cells expressing $CXCR4^{eGFP}$-P2.58 or $\Delta CXCR4^{eGFP}$-P2.59 in the absence or presence of UII (10^{-9} M, 15 and 30 min). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test; ns, not significant; **P<0.01; ***P<0.001. (C) Immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against paxillin (*red*) in HEK293 cells expressing $CXCR4^{eGFP}$-P2.58 (*green*) in the absence or presence of SDF-1α administered for

5 to 60 min. Merge images allowed visualization of receptors and paxillin in the plasma and cytosolic compartments (yellow). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 40 µm. White squares on the pictures illustrate the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Scale bars indicate 15 µm. (D and E) Quantification of FA points per cell (D) and distribution of FA areas (E) in HEK293 cells expressing $CXCR4^{eGFP}$-P2.58 in the absence or presence of SDF-1α (10^{-9} M) administered for 5 to 60 min. FA areas are measured using a successive image treatments, and the proportion of FA comprised between 0 to 0.1 µm² (white), 0.1 to 0.2 µm² (light grey), 0.2 to 1 µm² (dark grey) and higher than 1 µm² (black) were quantified for each time treatment. (F) Percentages of cells presenting a receptor membrane labeling (white), membrane and intracellular labelings (grey) were quantified. (G) The interaction between receptor and β-Arrestin 2 was investigated on HEK293 cells expressing eYFP-tagged CXCR4-P2.58, ΔCXCR4-P2.58A or ΔCXCR4-P2.59 receptor in combination with DNA encoding β-Arrestin 2^{Rluc8}. BRET signal between eYFP-tagged receptors and β-Arrestin 2^{Rluc8} was monitored in the presence of increasing concentrations of UII. Data are mean ± SEM from 3 independent experiments.

Figure S4. **CXCR4-P2.58-induced lamellipodia formation.** (A) Images of representative cells transfected with cDNAs encoding $CXCR4^{eGFP}$-P2.58 in the absence or the presence of SDF-1α (15 min, 10^{-9} M). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars correspond to 20 µm. (B) Percentage of cells expressing $CXCR4^{eGFP}$-P2.58 presenting membrane labeling (grey bars), no lamellipodium (●), one lamellipodium (■) or more (▲), after exposure to SDF-1α (10^{-9} M) for 5 to 60 min.

Figure S5. Wild-type and mutant Kiss1R and UT-induced stimulation of ERK1/2. (A) Determination of both total and phosphorylated ERK1/2 on HEK293 cells expressing $Kiss1R^{Myc}$-P2.59 (*upper panel*) or $\Delta Kiss1R^{Myc}$-P2.58 (*lower panel*) in the absence or the presence of KP-10 (10^{-9} M) from 5 to 120 min. Western blots were performed using specific antibody against total or phospho (P-ERK1/2, Thr202/Tyr204) ERK1/2. Quantifications were performed with ImageLab® software. Histograms represent ratio P-ERK1/2 /total ERK1/2 of one representative experiment. (B) Determination of both total and phosphorylated ERK1/2 on HEK293 cells expressing UT^{Myc}-P2.58 (*upper panel*) or ΔUT^{Myc}-P2.59 (*lower panel*) in the absence or the presence of UII (10^{-9} M) from 5 to 120 min. Western blots were performed using specific antibody against total or P-ERK1/2. Quantifications were performed with

ImageLab® software. Histograms represent ratio P-ERK1/2/total ERK1/2 of one representative experiment.

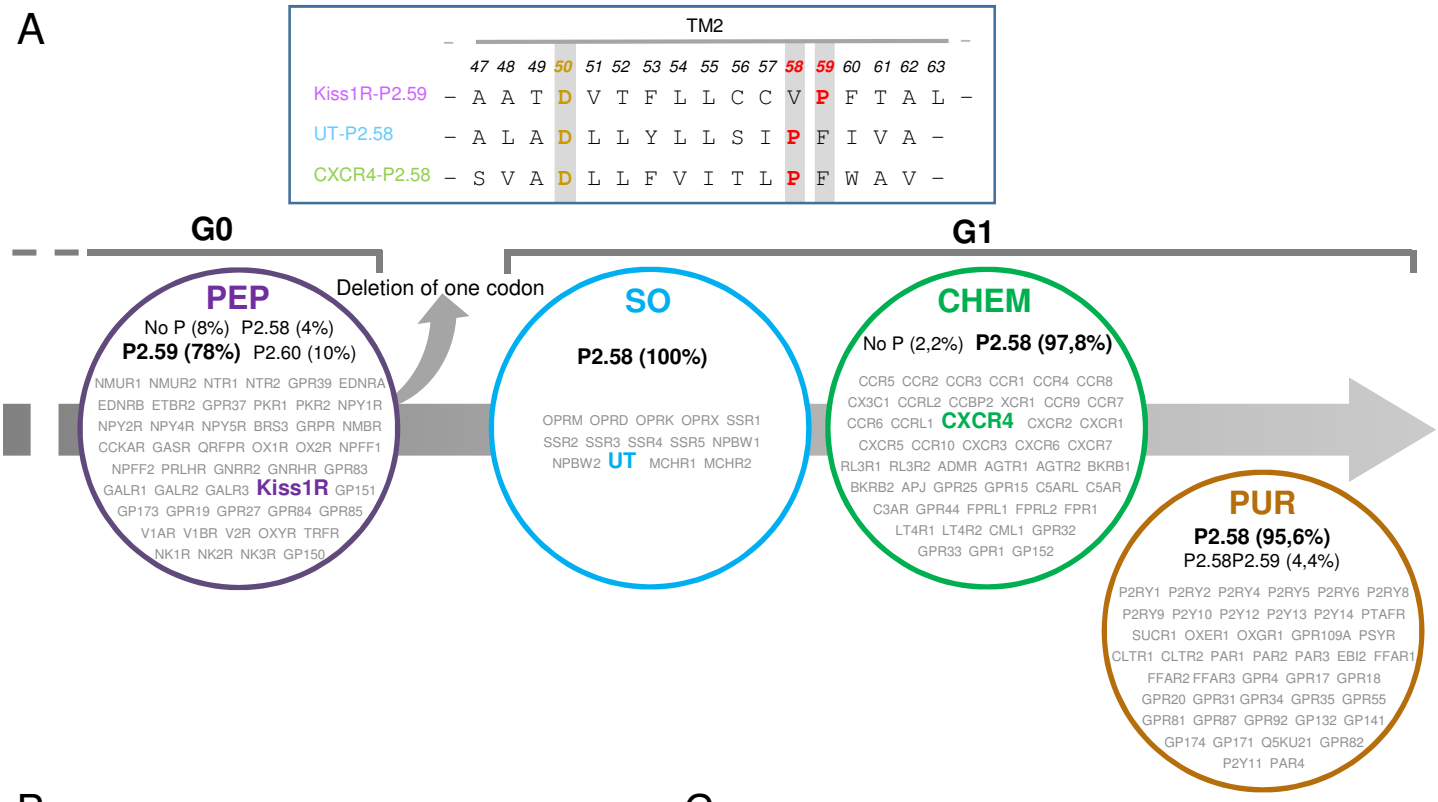
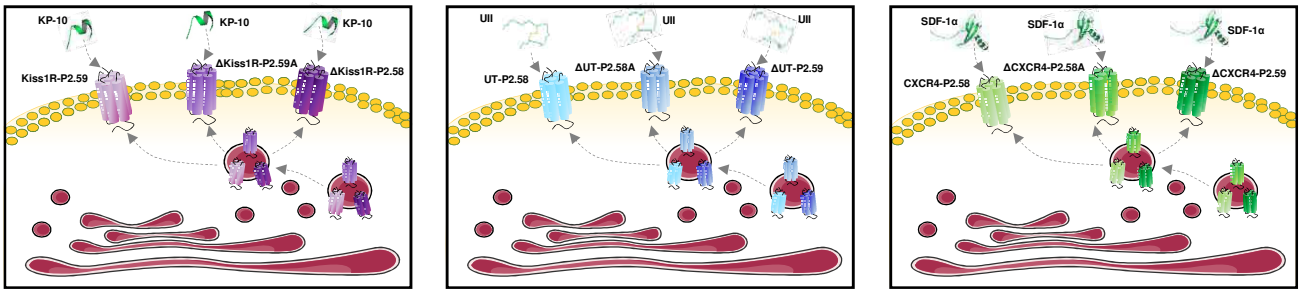
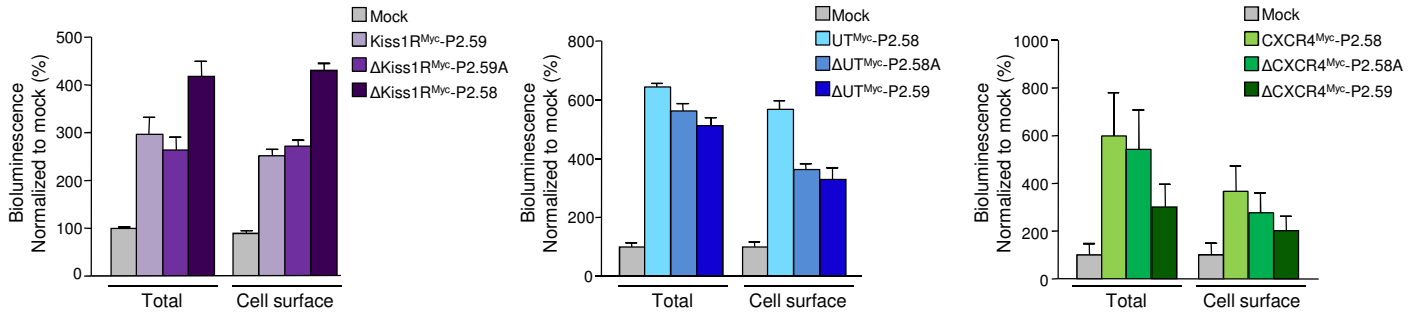


Figure 1, Joubert et al.

A



B Receptor cell expression



C Receptor ligand binding

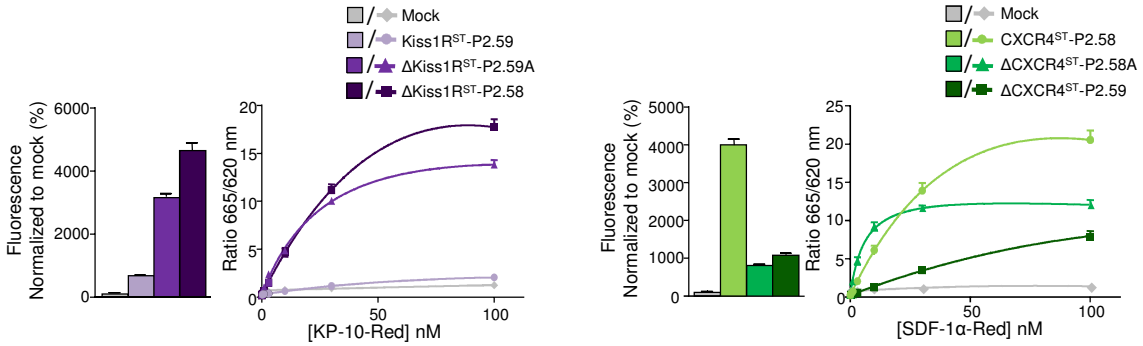


Figure 2, Joubert *et al.*.

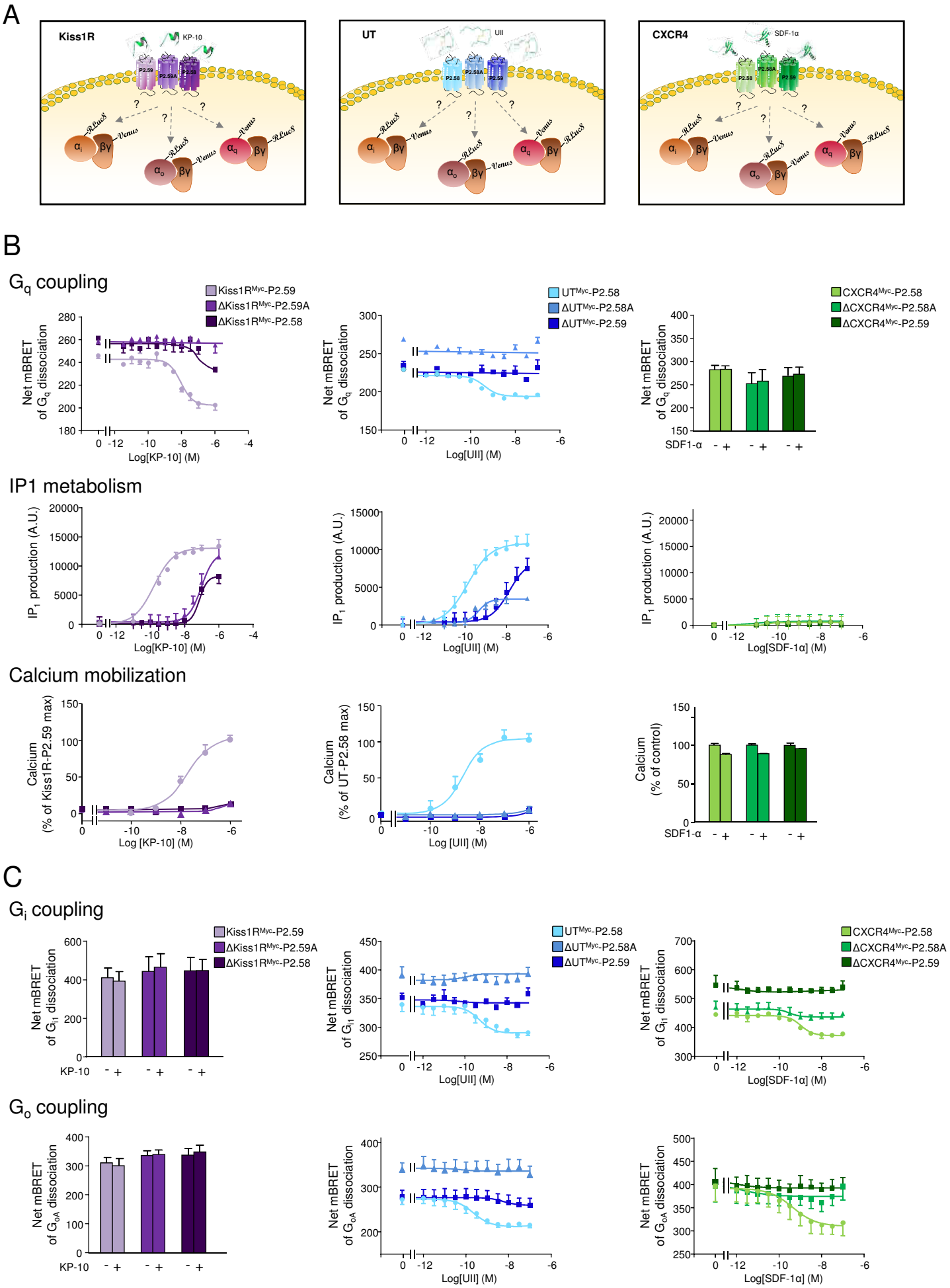


Figure 3, Joubert *et al.*

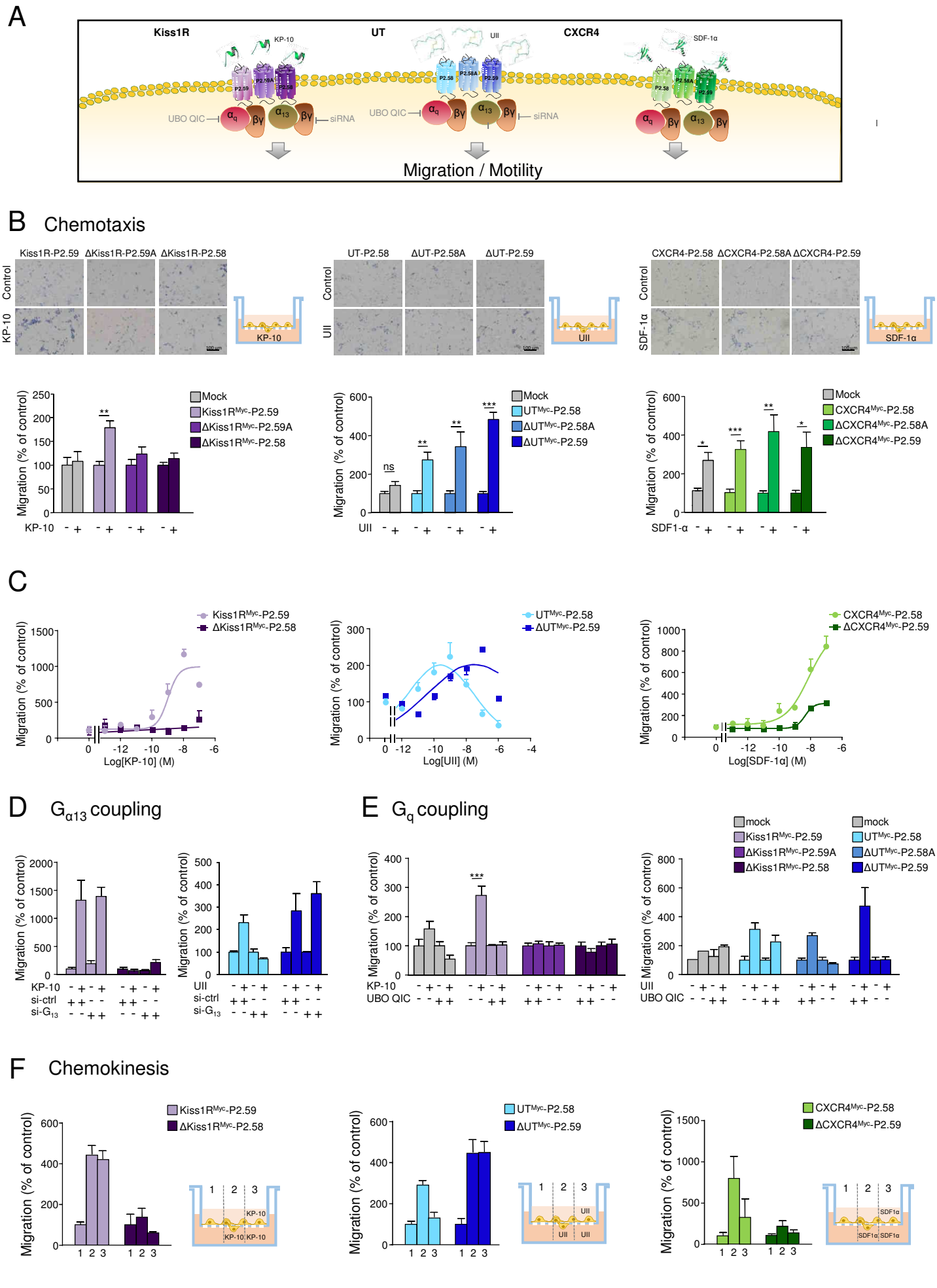


Figure 4, Joubert *et al.*

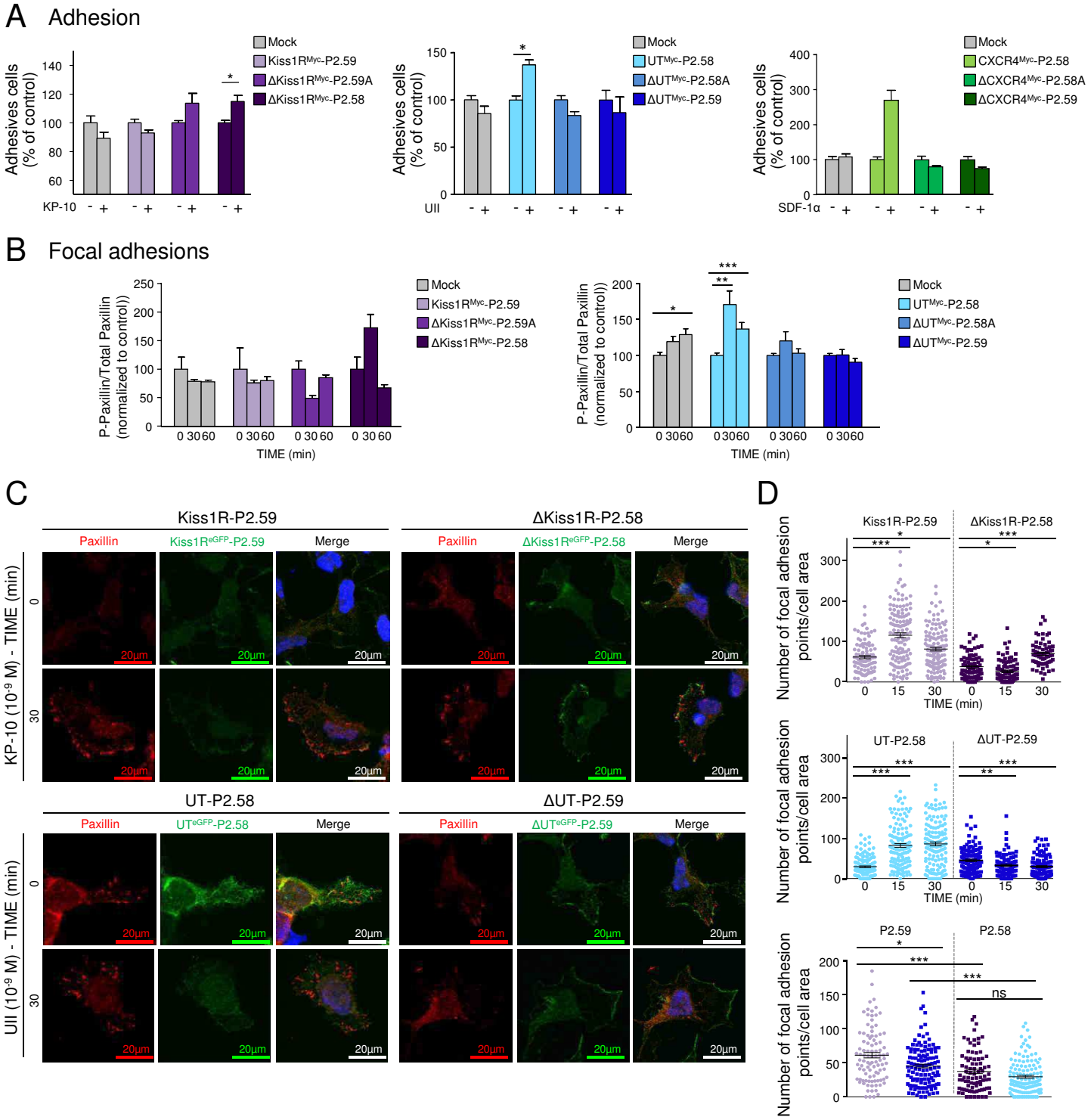
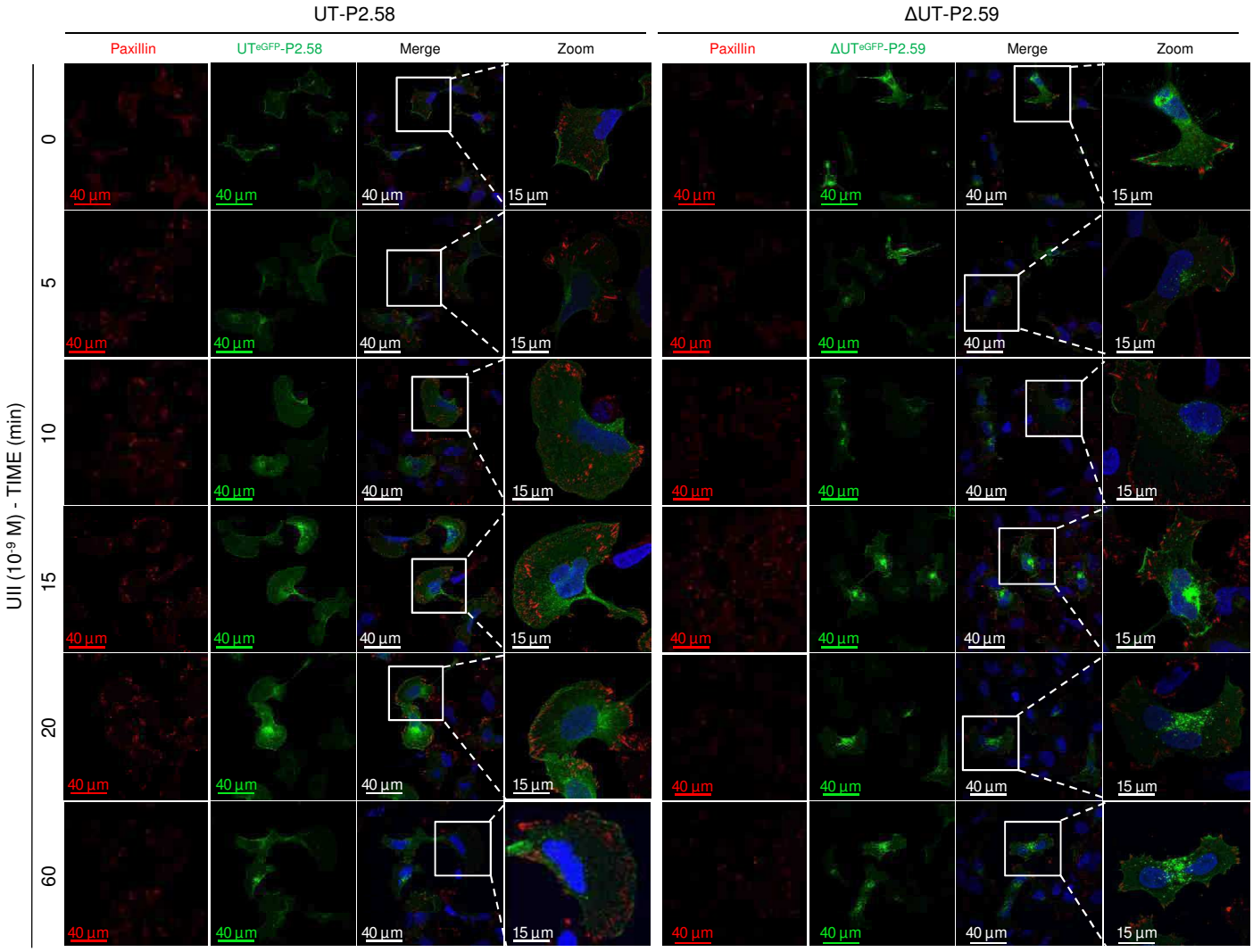
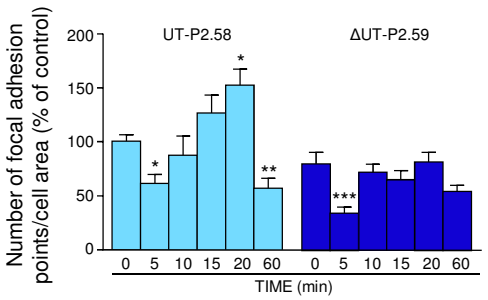


Figure 5, Joubert *et al.*

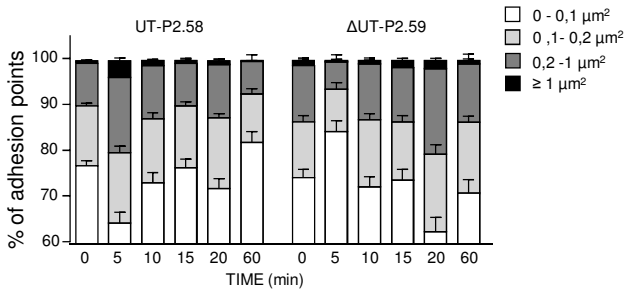
A Dynamic of cell adhesion



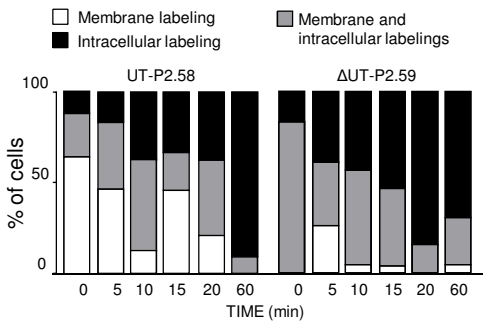
B Number of focal adhesion points



C Focal adhesion points areas



D Internalization



E BRET β-Arrestin 2

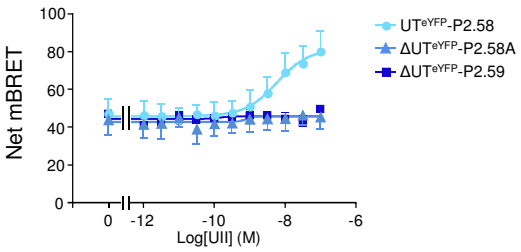
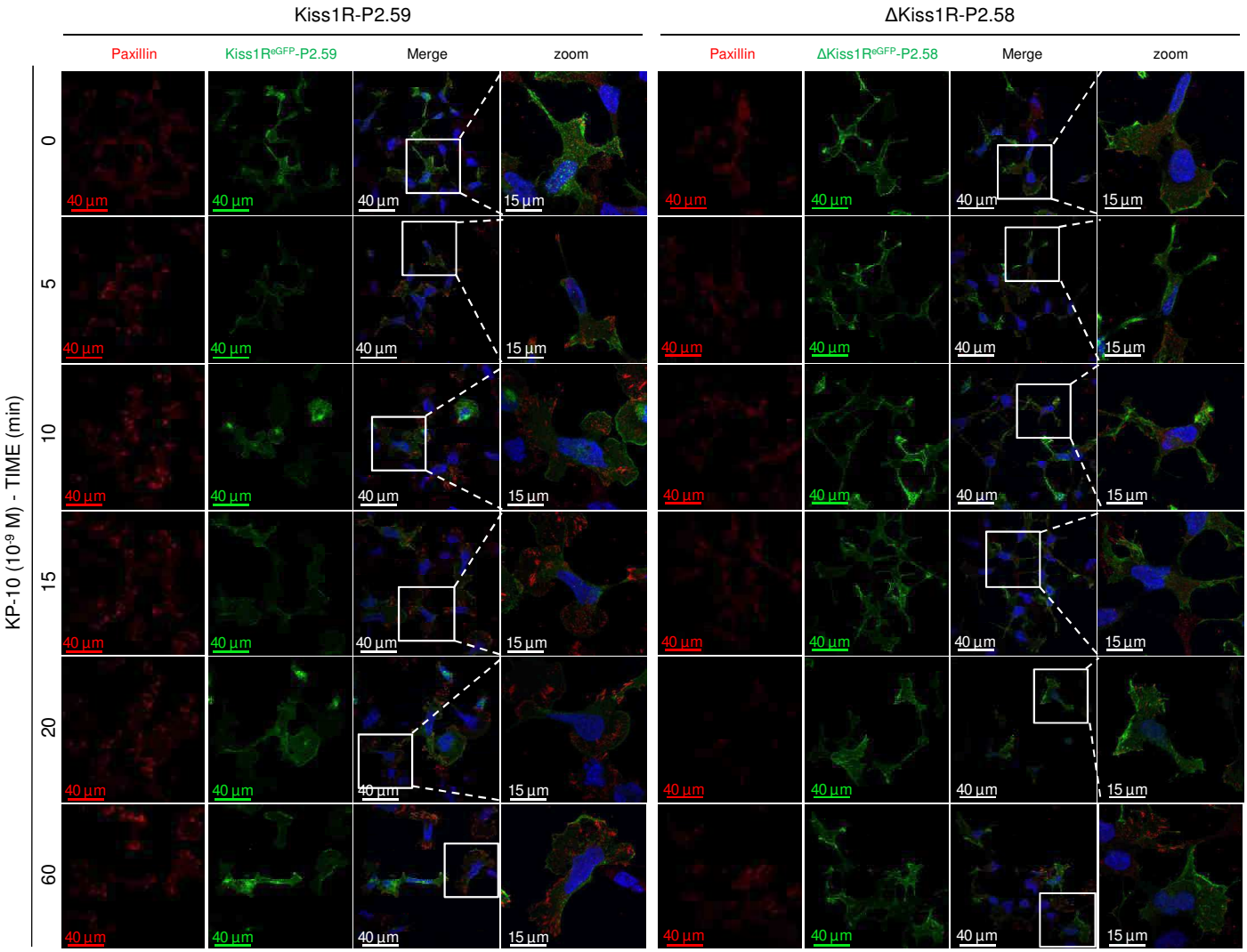
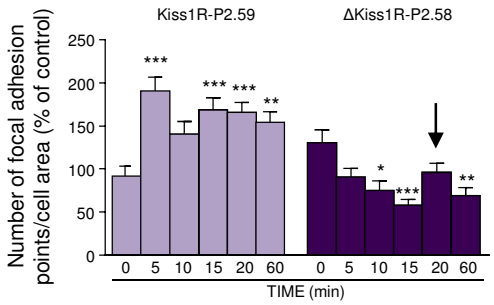


Figure 6, Joubert *et al.*

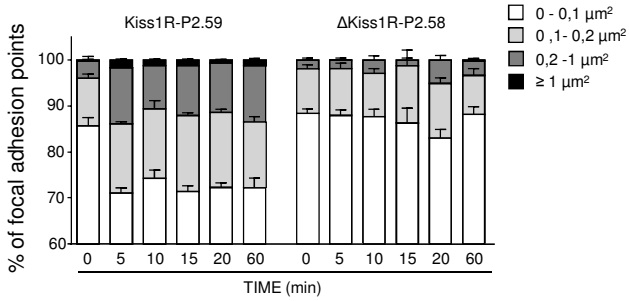
A Dynamic of cell adhesion



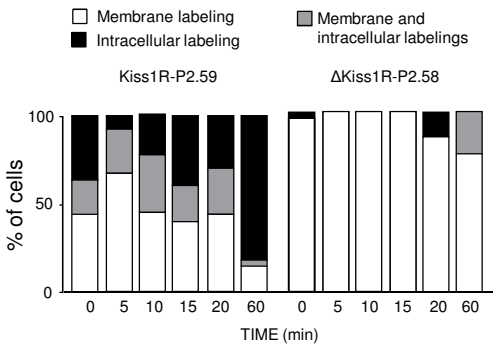
B Number of focal adhesion points



C Focal adhesion point areas



D Internalization



E BRET β-Arrestin 2

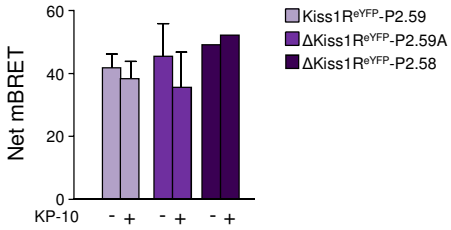


Figure 7, Joubert *et al.*

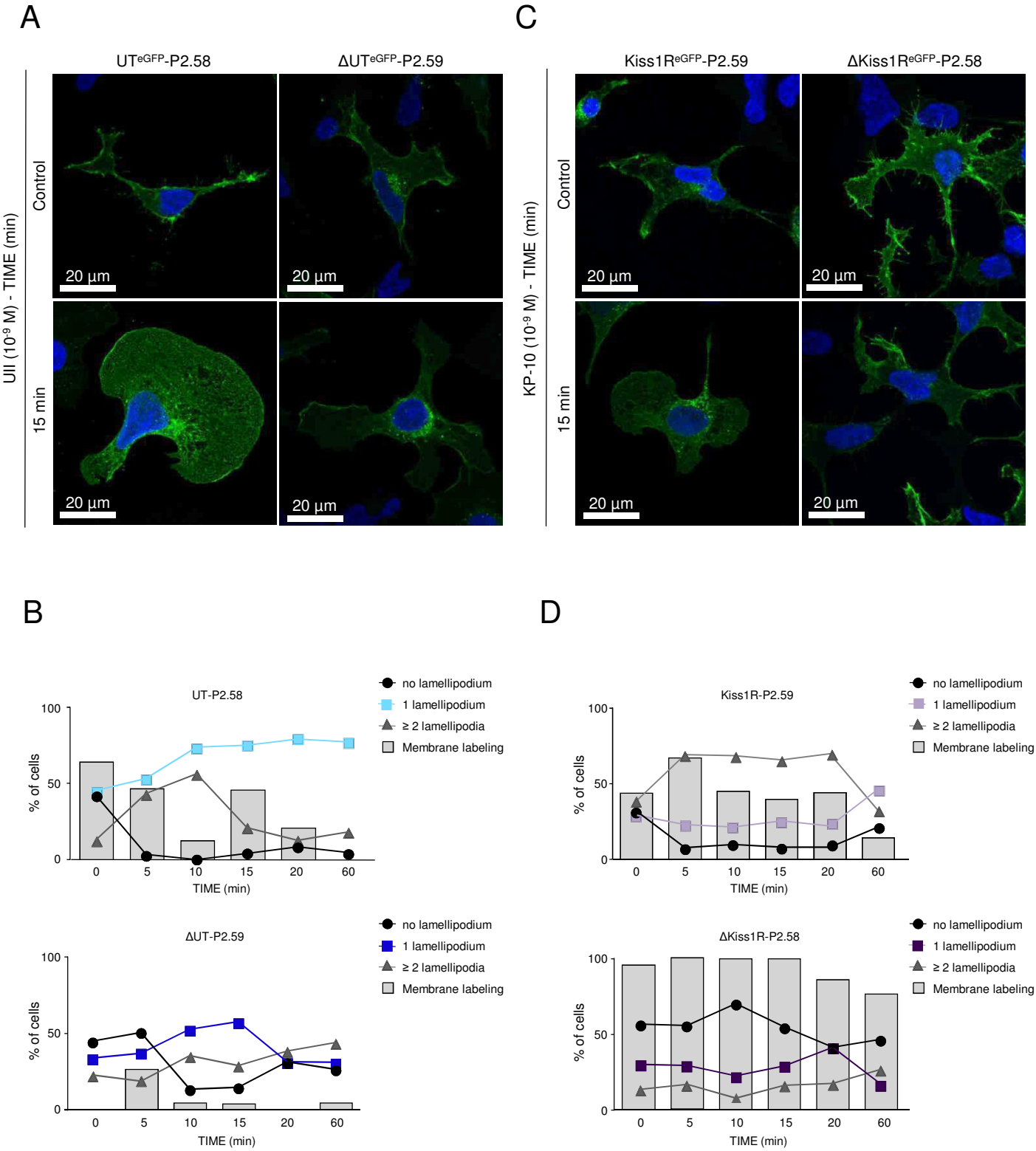
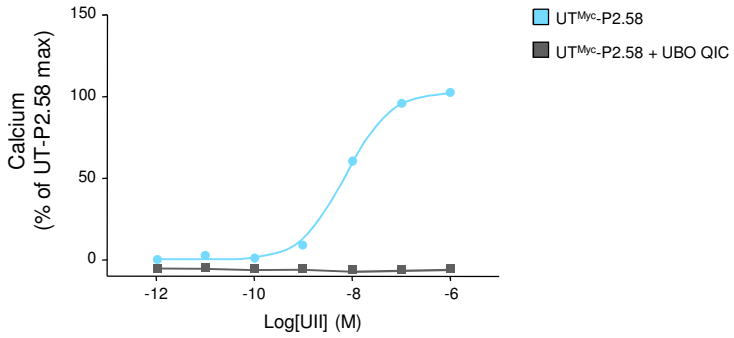


Figure 8, Joubert *et al.*

A G_q coupling



B siRhoGEFp63

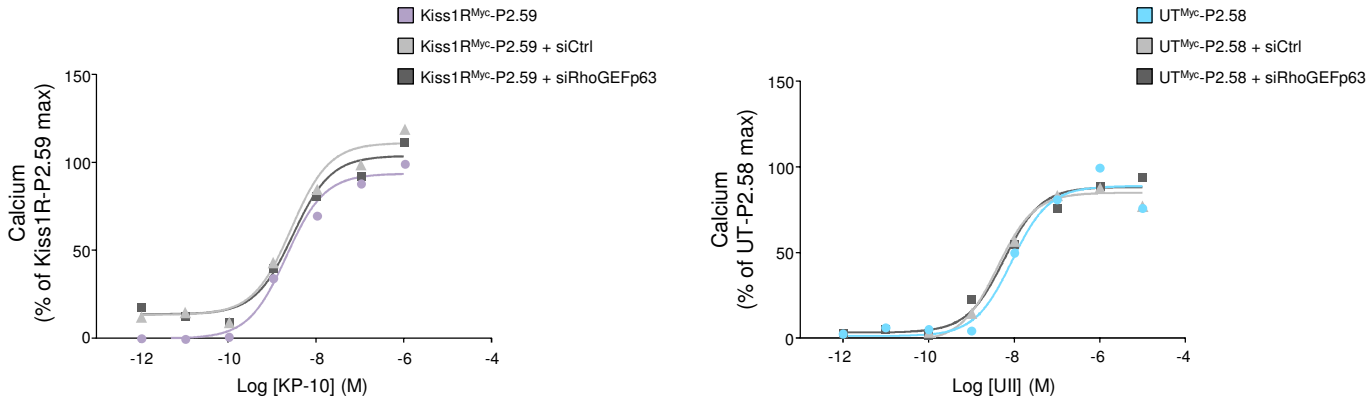


Figure S1, Joubert *et al.*

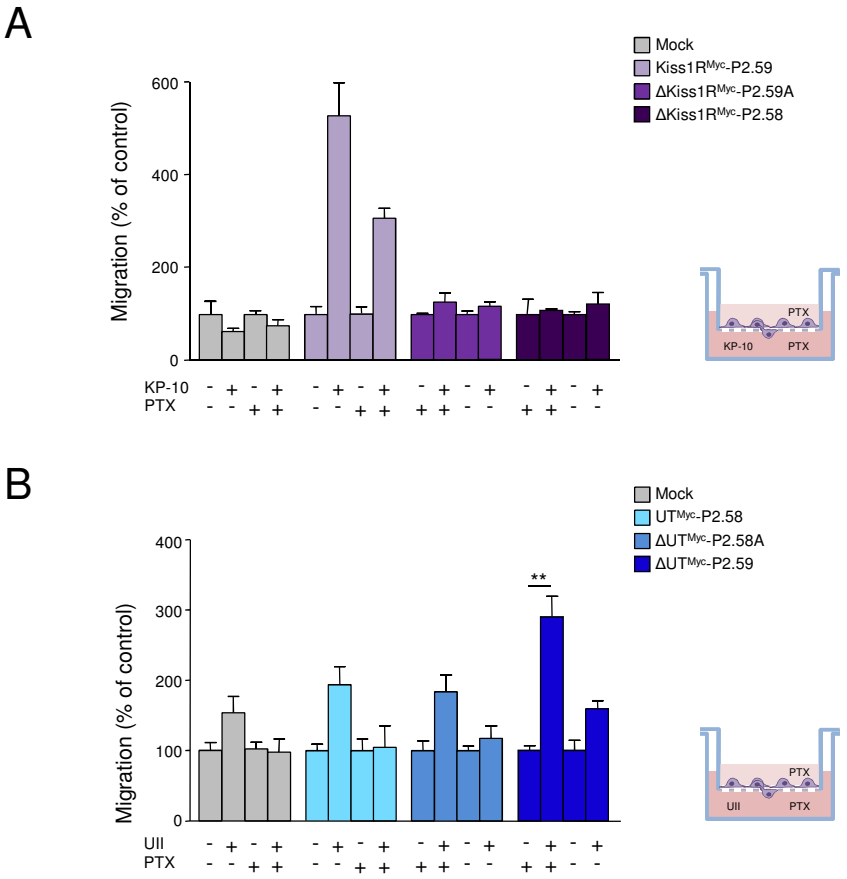


Figure S2, Joubert *et al.*

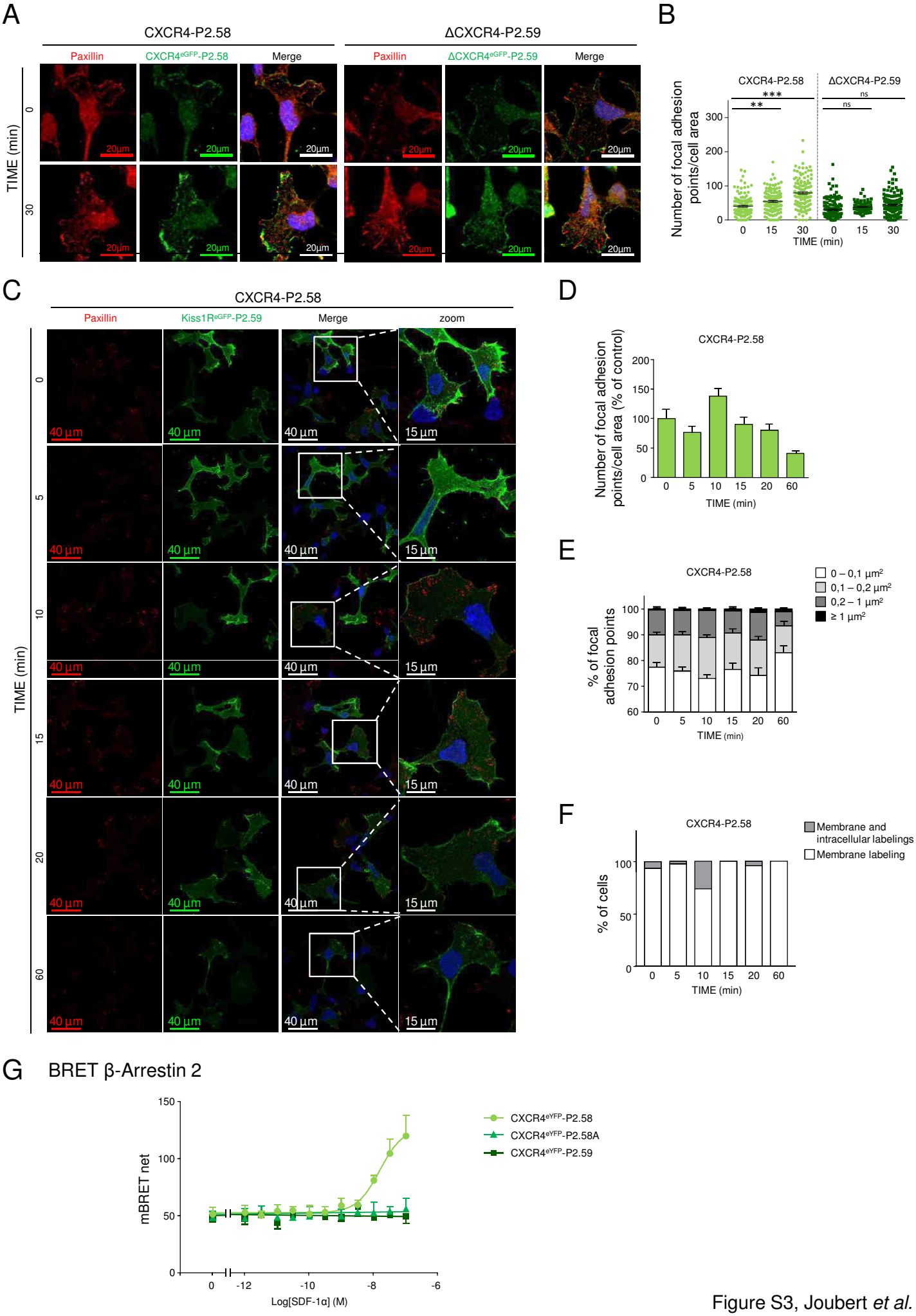
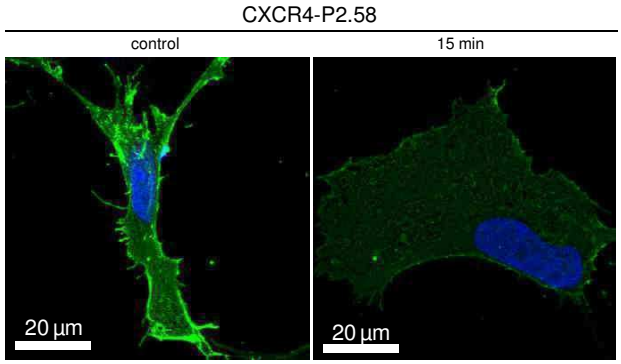


Figure S3, Joubert *et al.*

A



B

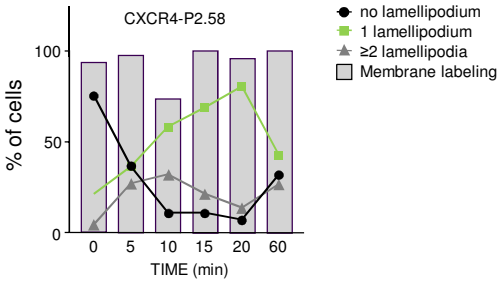
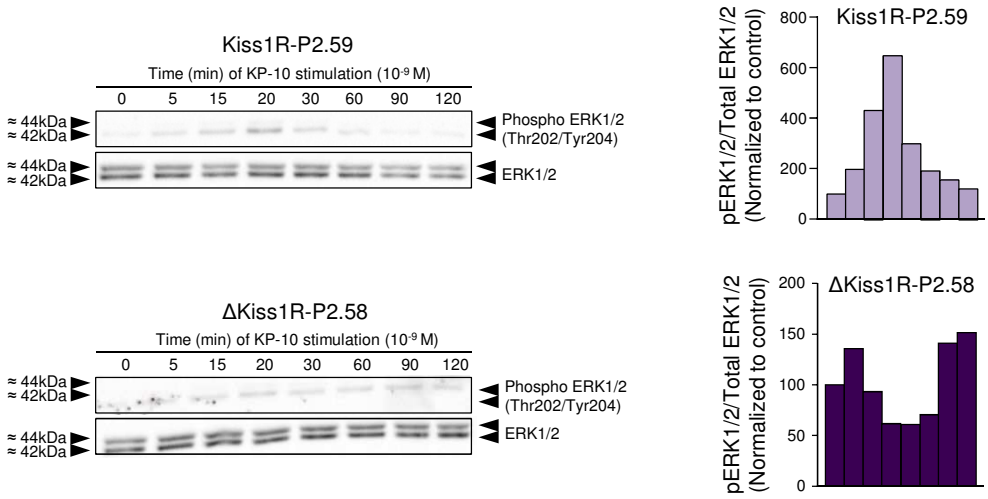


Figure S4, Joubert *et al.*

A



B

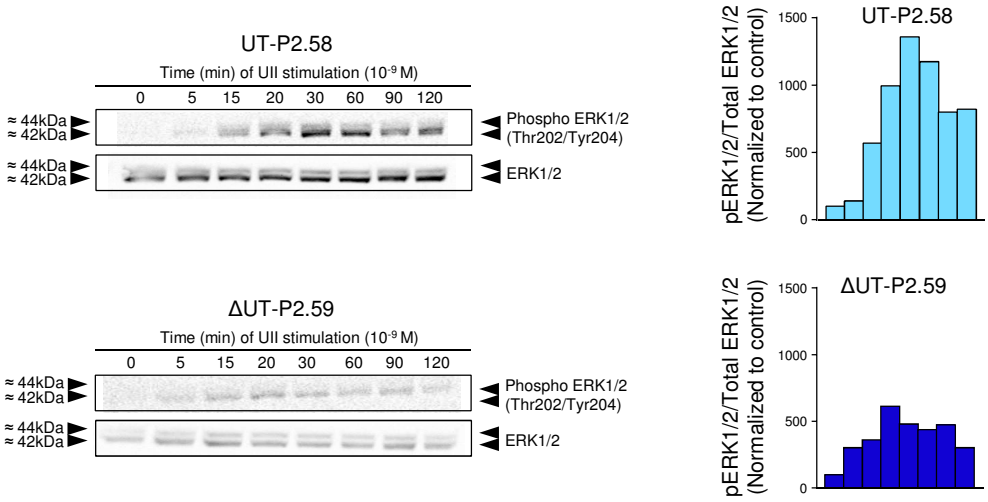


Figure S5, Joubert *et al.*