



HAL
open science

La protéine Gec1/Gabarapl1 : rôle au cours de l'autophagie et expression dans les cellules cancéreuses

Fatima Zahra Chakrama

► **To cite this version:**

Fatima Zahra Chakrama. La protéine Gec1/Gabarapl1 : rôle au cours de l'autophagie et expression dans les cellules cancéreuses. Cancer. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3007. tel-01613284

HAL Id: tel-01613284

<https://theses.hal.science/tel-01613284>

Submitted on 9 Oct 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.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE BESANCON

Doctorat de l'Université de Franche-Comté
Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé

La protéine GEC1/GABARAPL1 : rôle au cours de l'autophagie et expression dans les cellules cancéreuses

THESE

Soutenue le 12 Juillet 2011

Par

Fatima Zahra Chakrama

Membres du jury :

• **Rapporteurs**

Dr. Joëlle Wiels

DR2 CNRS, UMR 8126, Institut Gustave Roussy, Villejuif

Dr. Patrice Codogno

DR1 INSERM, U756, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry

• **Examineur**

Pr. Bruno Chatton

Professeur des Universités, IREBS, Université de Strasbourg

• **Directeur de thèse**

Pr. Michèle Jouvenot

Professeur des Universités, Université de Franche-Comté

• **Co-directeur de thèse**

Dr. Michaël Boyer-Guittaut Maître de Conférences, Université de Franche-Comté

A mon père, à l'homme qu'il était,
A ma famille et mes amis,

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier en premier lieu les membres des jurys : Madame le directeur de recherche Joëlle Wiels, Monsieur le directeur de recherche Patrice Codogno, ainsi que Monsieur le professeur Bruno Chatton, pour avoir accepté de juger ce travail. Je leur exprime ainsi toute ma gratitude.

Mes sincères remerciements s'adressent particulièrement à mes directeur et co-directeur de thèse : le professeur Michèle Jouvenot et le docteur Michaël Boyer-Guittaut.

Michèle, je vous remercie de m'avoir acceptée dans votre laboratoire et de m'avoir soutenue tout au long de ces années tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Vos conseils m'ont souvent été d'une très grande aide. Je ne pourrai oublier vos enseignements, qui ont sans doute réveillé en moi l'envie de continuer en recherche. Je ne vous remercierai jamais assez.

Michaël, je te remercie pour ton soutien et tes bons conseils qui m'ont permis de reprendre courage quand il le fallait, en m'aidant à voir le bon côté des choses. Je te suis redevable surtout d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la liberté de gérer ce projet ainsi que ton élan de motivation qui m'a été très utile et qui m'a permis d'avancer avec assurance et enthousiasme. Merci pour ton aide, ta disponibilité et tes idées scientifiques brillantes qui témoignent d'un charisme scientifique sans faille. Je te remercie pour ton encadrement et tes enseignements dont j'ai pu bénéficier pendant toutes ces années. Je garderai en mémoire tes qualités scientifiques et humaines mais surtout ton sens de l'organisation et tes initiatives à restaurer de nouvelles règles pour le bon fonctionnement du laboratoire et surtout tes séances de rangement des congélos !! Enfin, Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre grâce à toi et j'espère sincèrement qu'on gardera contact. Je te souhaite ainsi le meilleur à venir que ce soit sur le plan professionnel mais également que du bonheur avec ta petite famille et reviens nous d'Alabama avec des souris KO : GABARAPLI ou encore mieux des doubles KO : GABARAP/GABARAPLI.

Je remercie également tous les collègues du laboratoire : Régis, Annick, Pascale, Jean, Gilles et Mai.

Régis, j'ai été contente de t'avoir eu comme tuteur pour mon monitorat mais j'ai surtout apprécié le travail avec toi pour la préparation des enseignements. Merci pour ta joie et ta bonne humeur.

Annick, je te remercie pour les conseils que tu m'as donnés et notamment pendant la période de préparation de l'oral de thèse. Merci également pour ton humour.

Pascale, je tiens particulièrement à te remercier pour ton aide proposée lors de ma recherche d'appartement à Lyon, mais je te remercie surtout pour tes conseils d'experte en immortalisation des cellules.

Jean, à la fin de cette thèse j'aurai retenue ton expression de tous les jours «ça fait plaisir» et en effet ça m'a fait plaisir de te connaître et merci également pour tes conseils.

Gilles, il m'a été agréable de te côtoyer au laboratoire, ainsi je n'oublierai pas tes conseils prodigués lors de la réalisation de mon papier.

Mai, je te souhaite une très bonne retraite épanouie, même si je sais pertinemment que tu n'oublieras pas la biochimie.

Enfin, je garderai en mémoire vos enseignements de qualité remarquable.

Je voudrais ainsi remercier tout les membres de l'équipe EA3922 du laboratoire de biochimie et d'histologie que je n'ai encore pas nommé: Dominique, Pierre-Yves, Saïd, Hélène, Nadège, Karine, Gabrielle, Nassima, Fabrice, Christophe, Annie et les deux Claude.

Et puis, je voudrais remercier tous les étudiants qui ont croisé ma route. Stéphanie, ce fut un plaisir de partager la fin de thèse avec toi. J'espère que tu vas t'épanouir dans ton nouveau job, mais surtout dans ta vie familiale car je sais que cela compte énormément à tes yeux. Nicolas, nicole, je vous souhaite une bonne fin de thèse tout en douceur et ne m'oubliez pas pour vos thèses. Nicole, merci pour les conseils linguistiques dont j'ai beaucoup appris. Elise, Karine, Sophie et Sandrine, je vous souhaite le meilleur pour la suite. Enfin, ma petite Anne, un très grand merci pour tes conseils judicieux mais aussi pour les soirées qu'on passait ensemble. Je peux donc vous donner rendez-vous à toutes pour un ciné à Besançon ou à Lyon ou encore à Dijon. Un très grand merci à François pour sa bonne humeur et sa sympathie et à Elodie Bedel pour son soutien et son aide précieuse ces derniers temps.

Enfin, je ne pourrai oublier notre technicienne Valérie et notre secrétaire Martine que j'apprécie énormément et que je remercie pour le temps passé au laboratoire et en dehors aussi. Je vous remercie pour tout et vous souhaite une très bonne continuation !

Mes plus chaleureux remerciements vont à ma famille et particulièrement à ma mère : Maman, merci pour ton soutien moral et financier. Tu as toujours été là pour moi depuis le début de ce long cursus universitaire. Sans toi je n'aurais jamais réussie. Tu m'as beaucoup aidé et encouragé malgré ces milliers de kilomètres qui nous séparent. Tu es pour moi un modèle de courage, de patience et de persévérance que je prends et prendrai toujours comme référence pour ma vie personnelle et professionnelle. Ainsi, je me permets de te dédier tendrement ce travail et espère que tu sois fière de ta petite fille. Je dédie spécialement ce travail à l'âme de mon père qui j'espère de là haut sera également fier de moi.

Je remercie particulièrement mon grand frère El Mahjoub, Souad, ma petite nièce adorable Hafsa, mon frère Mohammed et Amina. A travers ces quelques lignes, je vous exprime mes profonds remerciements pour votre soutien et tout ce que vous m'avez offert.

Je souhaiterais remercier également toute ma famille au Maroc que je ne pourrais pas nommer les uns après les autres. Mes profonds remerciements s'adressent à MiZineb et ses enfants (Laila, Touria, Nadia, Hohi, Abderrazak et Nadia ainsi que leurs enfants Amina et Abdellah), à mes tantes Rabia, Aicha, Rachida, Malika et Khadija de Rabat et leur famille.

Un très grand merci pour mon cousin Hassan, notre cardiologue adoré, merci d'avoir cru en moi en te portant garant pour poursuivre mes études en France. C'est le fruit de ton engagement que je te dédie tout particulièrement.

Et maintenant, je vais remercier mes amis avec qui j'ai passé des moments inoubliables et je commence par remercier mes alliés dans l'aventure au CROUS : Khalid et Rachid. Je vous remercie pour votre aide et votre soutien, je ne pourrai jamais oublier nos aventures et anecdotes et le temps passé ensemble. J'avoue que je n'avais pas le mal du pays en votre compagnie. Votre union avec deux superbes et charmantes femmes m'a permis ainsi de retrouver deux autres amies : Céline et Hayat que j'apprécie tout particulièrement ainsi que la petite Housna. Enfin, pour être brève, vous êtes ma famille de Besak city. Je vous souhaite que du meilleur pour l'avenir.

Aziz, je te remercie pour la joie et la bonne humeur qui t'anime au quotidien. J'ai été très contente de te connaître et j'ai beaucoup apprécié tes moments de délires et de folies. A titre d'information, les plinthes attendent toujours !!

Mes chaleureux remerciements vont à mon amie Halima du nord. Je te remercie pour tout ce que tu as pu faire pour moi, la liste est évidemment longue. Te déplacer pour assister à ma thèse m'a tout particulièrement touchée, tu es quelqu'un de bien et je te souhaite que du bonheur.

Il m'est impossible d'oublier notre beau petit couple d'amoureux Haifa et Ridoin. Je suis ravie d'avoir fait votre connaissance mais aussi très contente que cette belle union que j'espère durera très longtemps a pu voir le jour dans la chambre 229, si vous voyez ce que je veux dire. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Et maintenant, mes remerciements s'dressent à la toute dernière recrue de ce cercle d'amis, Joël. J'ai été ravie de te connaître et partager des moments avec toi. Tu m'as fait découvrir la Franche-Comté et ses saveurs et bientôt tu me feras découvrir le sud peut-être !! Merci pour ton aide, ton soutien et ta gentillesse. J'espère avoir de tes nouvelles le plus souvent et je te souhaite une très bonne continuation. Tu me causes !!

Je remercie également les personnes que j'ai rencontrées sur les bancs de la fac et qu'au fil du temps sont devenus de très bons amis.

Stéphanie, je te remercie pour ton soutien et ton aide que je ne pourrai jamais oublier. Et ne t'inquiètes pas, on la fera cette photo les deux devant la maison blanche !!

Mon amoureuse Ornella et RDS Dzenane, que dire de plus que je vous admire et que j'ai apprécié les révisions à vos côtés en Master, ce fut un énorme plaisir. J'espère que vous serez comblés de bonheur et d'amour. Je n'en doute pas une seconde, RDS sait faire et toi aussi mon amoureuse et ne m'oubliez pas pour votre mariage. J'irai à Nazaré, à Etupe ou à Conflans. Peu importe où ce beau mariage aura lieu, j'irai !

Le gentleman marseillais, Toufik, je suis très contente de te connaître mais surtout impressionnée de ta belle tablette de chocolat super bien dessinée si tu vois ce que je veux dire !!! Je te souhaite une très bonne fin de thèse, je viendrai à ta thèse, promis ! C'est à charge de revanche !

Dzenan et Toufik, j'ai failli oublier mais j'espère que les perceuses soient toujours aussi bien fonctionnelles et je vous laisse seulement le choix entre la Bosch et la Black & Decker.

Je souhaiterais remercier également toutes les personnes qui m'ont aidé ou soutenu lors de la réalisation de ce travail : La famille Borges, Laurie, Marie-Laure, Maëlle, Fatou, Mimoune, Badia, Abdellah, Othman, Karima, Abdelhamid, Rajae, Sanae, Ilhame, Fatima-Zahra, Hanane, Majid, Simo, Naima et la famille Araza.

Enfin mes amis, j'espère vraiment qu'on gardera contact. Comme vous le savez je prends mon envol à Lyon, et je tacherai à ce que ma porte soit toujours grande ouverte afin de vous accueillir.

Sommaire

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE.....	11
ABREVIATIONS.....	15
CADRE ET BUT DU TRAVAIL.....	19
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	23
I-LE GENE <i>GEC1/GABARAPL1</i>	25
1)-Historique du gène <i>gecl/gabarapl1</i> : un gène de la sous-famille <i>gabapap</i>	25
2)-Expression et régulation du gène <i>gabapapl1</i>	27
3)-Expression de <i>gabapapl1</i> dans les conditions pathologiques	35
II-LES PROTEINES DE LA SOUS-FAMILLE GABARAP	37
1)-Séquences et structures	37
2)-Expression et localisation	38
3)-Rôles des protéines de la sous-famille GABARAP	40
III-L' AUTOPHAGIE	51
1)-Historique et généralités.....	51
2)-Mécanisme de l'autophagie.....	55
3)-Acteurs de l'autophagie.....	58
4)-Rôles de l'autophagie	68
MATERIELS ET METHODES	85
I-BIOLOGIE MOLECULAIRE	87
1)-Vecteurs	87
2)-Protocoles	89
3)-Mutagenèse dirigée.....	91
II-CULTURE CELLULAIRE	92
1)-Entretien des cellules	92
2)-Congélation et décongélation	93
3)-Transfection cellulaire	93
4)-Lignées cellulaires établies.....	94
5)-Immortalisation des cellules MEFs: <i>GABARAP^{-/-}</i>	96
6)-Test de viabilité cellulaire.....	97
7)-Traitement chimiques des cellules	98
8)-Marquage des cellules et microscopie confocale.....	100
III-BIOCHIMIE DES PROTEINES	100
1)-Extraction des protéines à partir de cellules	100
2)-Extraction de protéines à partir de tissus	101
3)-Protocole d'extraction et de dosage des protéines	102
4)-Western-blotting.....	102
RESULTATS/DISCUSSION	105
I-GABARAPL1 (<i>GEC1</i>) EST ASSOCIEE A DES VESICULES AUTOPHAGIQUES	107
II-EXPRESSION DE LA PROTEINE GABARAPL1 DANS DES LIGNEES CELLULAIRES ET DANS DES CONDITIONS PATHOLOGIQUES	120
1)-Recherche d'un anticorps spécifique de la protéine <i>GABARAPL1</i>	120
2)-Etude de l'expression de la protéine <i>GABARAPL1</i> dans différentes lignées cellulaires	127
3)-Etude de l'expression de la protéine <i>GABARAPL1</i> dans les tissus tumoraux	131
III-GABARAPL1 ET DROGUES ANTI-CANCEREUSES	140

1)-Régulation de l'expression de GABARAPL1 par différentes drogues utilisées en thérapie anti-cancéreuse	140
2)-Régulation de l'action des drogues chimiothérapeutiques dans les cellules MCF-7 surexprimant la protéine GABARAPL1	143
IV-DEVELOPPEMENT DE MODELES CELLULAIRES POUR L'ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE GABARAPL1 ...	147
1)-Etablissement d'une lignée cellulaire stable HEK293 exprimant la protéine mutée FLAG-GABARAPL1-G116A-6his.....	147
2)-Etablissement d'une lignée immortalisée MEF:GABARAP ^{-/-}	149
3)-Etablissement des lignées MCF-7 et HEK293:DsRed-GABARAPL1	156
DISCUSSION GENERALE.....	157
1)-Caractérisation du rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie.....	159
2)-Régulation de l'expression de la protéine GABARAPL1	165
3)-Perspectives à long terme	173
BIBLIOGRAPHIE.....	175
PUBLICATIONS ANNEXES	199
Revue : « GABARAPL1: Original or copycat? »	201
Publication : « Identification of HSP90α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein »	213
COMMUNICATIONS ORALES	245
COMMUNICATIONS AFFICHEES.....	249
ANNEXES	263

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT : akr t cell lymphoma
AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid
AMPK : adénosine monophosphate protein kinase
Atg/Apg : autophagy gene
AP-1 : activator protein-1
ARH : autosomal recessive hypercholesterolemia
ARN : acide ribonucléique
AT1 : angiotensine de type 1
BafA1 : bafilomycine A1
Bcl-2 : B cell lymphomas 2
Bcl-XL : B cell lymphomas-extra large
BET : bromure d'éthidium
BIF-1 : bax-interacting factor-1
BMAL1 : brain and muscle ARNt-like protein 1
BNIP3 : Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3
BNIP3L : Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like
BSA : bovine serum albumin
CLOCK : circadian locomotor output cycle kaput
CMA : chaperon mediated autophagy
CRY : cryptochrome
DDX47 : dead box polypeptide 47
DEC : *differentiated embryo chondrocyte*
DMEM : dulbecco's modified eagle's medium
DMSO : diméthyl sulfoxyde
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate
E₂ : estradiol-17 β
EBSS : earl's balanced salt solution
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EGFP : enhanced green fluorescent protein
ERE : estrogen reponse element
FIP200 : focal adhesion kinas (fak) family interacting protein of 200 kD
FHRE : forkhead reponse element
FOXO : Forkhead box *transcription factors of O class*
FRT : flp recombination target
GABA_A : γ -aminobutyric acid type A
GABARAP : GABA_A receptor-associated protein
GABARAPL : GABARAP like
GATE16 : Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa
GEC1 : glandular epithelial cell 1
GFP : green fluorescent protein
GluR1 : glutamate receptor type 1
GnRH : Gonadotropin-releasing hormone
GnV-3 : gonadotropin releasing hormone immortalized neurons
GST : glutathion S-transférase
HER2 : human epidermal growth factor receptor 2
HIF1 α : hypoxia-inducible factor 1 α
HMGB1 : high-mobility group box 1
HSP : heat shock protein
IGF : insulin-like growth factor
INR : initiator element
JNK : jun n-terminal kinase
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
KOR : κ opioide receptor
kpb : kilo-paires de base
LAMP : lysosomal-associated membrane protein
LB : Luria Bertani medium
LC3 : light chain 3
LIR : LC3-interacting domain
LYAAT : lysosomal amino acide transporter 1
MAP : microtubule-associated protein
Mcl-1 : myeloid cell leukemia sequence 1
MTOR : mammalian target of rapamycin
MTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1
NBR1 : neighbour of BRCA1
NH₄Cl : chlorure d'ammonium
NIX : *Nip-like protein X*
NSF : N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
OIS : oncogen-induced senescence
OMS : organisation mondiale de la santé
ORF : open reading frame
pb : paire de bases
PAS : Phagophore assembly site
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PE : phosphatidyléthanolamine
PER : period
pH : potentiel d'hydrogène
PI3P : phosphatidyl-inositol-3-phosphate
PMSF : Phénylméthylsulfonidefluoride
PRIP1 : *Phospholipase C-related inactive protein 1*
RAS : rat sarcoma
RE : réticulum endoplasmique
RE α et β : récepteur aux estrogènes α et β
RH : hormonal receptors
ROS : espèces réactives d'oxygène
TRPV1 : transient receptor potential vanilloïde 1
UBA : ubiquitin associated domain
ULK1 : unk51-like kinase
UTR : untranslated region
UVRAG : Ultraviolet irradiation resistance-associated gene
Vmp1 : vacuole membrane protein 1
SNARE : soluble NSF attachment protein receptor
WIPI : wd-repeated protein interacting with phosphoinositides
WT : wild type

Cadre et but du travail

Cette thèse, débutée en octobre 2008, s'inscrit dans les travaux de l'équipe EA3922 «Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central» et concerne l'étude du rôle de la protéine GEC1/GABARAPL1 au cours de l'autophagie et son expression dans les cellules cancéreuses.

Le gène *gec1/gabarapl1* (*glandular epithelial cell 1/GABA_A receptor-associated protein like 1*) a été identifié au sein de notre laboratoire lors d'un criblage d'une banque d'ADNc provenant de cellules d'endomètre de cobaye stimulées par les estrogènes. Le gène *gabapapl1* a donc été caractérisé comme un gène régulé positivement et précocement par les estrogènes (Jouvenot *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1993; Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Cependant, à cette époque, aucune fonction ou homologie avec un gène déjà décrit n'a pu être mise en évidence. Ce n'est qu'en 1999 et suite à la découverte du gène *gabapap* (*GABA_A receptor-associated protein*) (Xin *et al.*, 2001), un gène impliqué dans le transport du récepteur GABA_A, que nous avons repris les études sur la caractérisation du gène *gabapapl1*. En effet, les deux ADNc humains *gabapap* et *gabapapl1* présentent une forte homologie de séquence (79%) et sont considérés comme appartenant à la famille des gènes *gabapap* qui inclut deux autres gènes : *gabapapl2* et *gabapapl3*. Tous ces gènes codent des protéines de 117 acides aminés qui présentent également une forte identité de séquence.

Au laboratoire, des études ont été réalisées afin de déterminer si les deux gènes présentent le même profil d'expression et si les deux protéines GABARAP et GABARAPL1 sont redondantes *in vivo*. Ces travaux ont montré que ces deux gènes s'expriment de manière ubiquitaire dans les cellules et tissus mais présentent des profils différents. *Gabapapl1* est préférentiellement exprimé dans le système nerveux central alors que *gabapap* présente une expression importante dans le système endocriné. En revanche, il a été démontré que ces deux gènes s'expriment très faiblement dans les tissus et les lignées cancéreuses (Nemos *et al.*, 2003). Il a également été montré que le gène *gabapapl1* est le gène le plus exprimé de la famille *gabapap* dans le cerveau de rat, qu'il est exprimé exclusivement dans les neurones et qu'il présente une expression prédominante dans le pons et le diencephale (Tolle *et al.*, 2008). D'autre part, une étude de l'expression du messager *gabapapl1* sur une cohorte de 265 patientes atteintes de cancer du sein, effectuée en collaboration avec le laboratoire du Dr Descotes au CHU Lyon Sud, a montré que l'expression du gène *gabapapl1* est diminuée dans les cancers du sein et qu'une forte expression est corrélée à une meilleure survie des patientes (Berthier *et al.*, 2010).

Des études concernant la régulation du gène *gabapapl1* par les estrogènes ont également été entreprises dans notre laboratoire et ont conduit à la caractérisation des

séquences promotrices des gènes *gabapll* de cobaye et humain et notamment ont mis en évidence la présence d'un ERE (*Estrogen Response Element*) responsable de son estrogéno-dépendance (Vernier-Magnin *et al.*, 2005).

D'autres travaux ont été menés au laboratoire afin de caractériser la localisation cellulaire et le rôle biologique de la protéine GABARAPL1. Ces expériences ont montré que la protéine GABARAPL1 interagit avec la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A et la tubuline. Par ailleurs, GABARAPL1 induit la polymérisation de la tubuline en microtubule et participe au transport du récepteur GABA_A à la membrane post-synaptique *via* son interaction avec la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A et la tubuline (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006a; Mansuy *et al.*, 2004). Une autre équipe a montré que GABARAPL1 est aussi impliquée dans le transport du récepteur des κ opioïdes (Chen *et al.*, 2006). Mais, exceptées ces deux fonctions, le rôle de la protéine GABARAPL1 reste encore inconnu.

Mon travail de thèse s'inscrivait donc dans la thématique de notre équipe qui concerne l'étude fonctionnelle de la protéine GABARAPL1. Au début de ma thèse, il m'a été confié quatre aspects de l'étude de GABARAPL1 : 1) l'étude du rôle potentiel de GABARAPL1 au cours de l'autophagie, 2) l'étude de l'expression de GABARAPL1 dans les tumeurs, 3) l'étude de l'expression de GABARAPL1 en réponse à des drogues anti-cancéreuses, et 4) la création de nouveaux modèles cellulaires pour l'étude de la protéine GABARAPL1.

Rappels bibliographiques

I-Le gène *gec1/gabarapl1*

1)-Historique du gène *gec1/gabarapl1*: un gène de la sous-famille *gabarap*

Le gène *gec1* (*glandular epithelial cell 1*) a été découvert au sein de notre laboratoire lors du criblage d'une banque d'ADNc provenant de cellules épithéliales glandulaires d'endomètre de cobaye stimulées par les estrogènes (Estradiol-17 β , E2) en présence de cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique) (Pellerin *et al.*, 1993). Ce criblage a permis d'identifier un ADNc de 833 pb avec un signal de polyadénylation régulé positivement et précocement par les estrogènes chez le cobaye (Pellerin *et al.*, 1993). L'utilisation d'une sonde complémentaire de l'ADNc *gec1* a conduit à la caractérisation par northern-blotting d'un transcrit de 1,8 kb. Le séquençage, quant à lui, a révélé que cette partie de l'ADNc correspondait à la partie 3' terminale du transcrit *gec1*. L'organisation complète du gène *gec1* chez le cobaye a été établie dans notre laboratoire en 2001 (Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Le gène *gec1* est constitué de 10 065 pb, contient 4 exons et 3 introns et l'ADNc complet comporte 1921 pb (numéro d'accèsion GenBank : AF287012) (Vernier-Magnin *et al.*, 2001) (Figure 1).

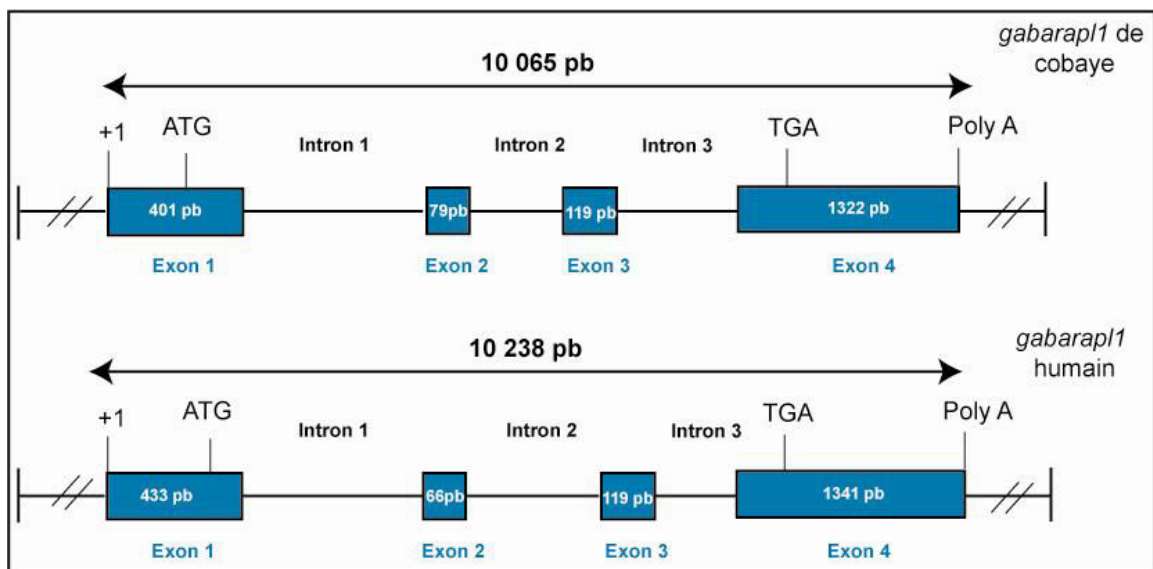


Figure 1 : Organisation du gène *gabapapl1* de cobaye et humain. Les traits continus et les rectangles représentent respectivement les introns et les exons. La position du site d'initiation de la transcription (+1), du codon d'initiation (ATG) et de terminaison (TGA) de la traduction ainsi que le site de polyadénylation (Poly A) sont indiqués. Les tailles des exons sont également indiquées. D'après Vernier-Magnin *et al.*, 2001.

Le gène homologue humain a été caractérisé *via* l'utilisation de sondes *gecl* de cobaye lors du criblage d'une banque d'ADNc de placenta humain. Ces expériences ont permis d'isoler l'ADNc humain de 1959 pb. Le gène *gecl* humain, localisé sur le chromosome 12, est constitué de 10 238 pb et contient 4 exons et 3 introns comme le gène *gecl* de cobaye (Figure 1). Par ailleurs, l'ADNc *gabapapl1* humain présente une forte homologie de séquence avec celui du cobaye (Figure 2). Ces deux ADNc codent des protéines de 117 acides aminés dont la séquence est conservée chez toutes les espèces.

La découverte du gène *gabapap* (*GABA_A receptor-associated protein*) en 1999 par Wang et collaborateurs a permis par la suite d'identifier une forte identité de séquence (79%) de ce gène avec celui de *gecl* (Wang *et al.*, 1999a). En revanche, aucune identité de séquence n'a été observée au niveau des UTR-5' et 3' de ces deux gènes (Figure 2). En 2001, Xin et collaborateurs ont cloné trois paralogues de l'ADNc *gabapap* humain : *gabapapl1* (*GABA_A receptor-associated protein like 1*), *gabapapl2/gate16* (*Golgi-associated ATPase enhancer*), un gène impliqué dans le trafic intracellulaire (Sagiv *et al.*, 2000) et un pseudogène dénommé *gabapapl3*. Tous ces gènes appartiennent à la même famille des gènes *gabapap* du fait de leur forte identité de séquences (Xin *et al.*, 2001).

Du fait de cette forte homologie, le gène *gecl* est maintenant appelé *gabapapl1*. Nous utiliserons donc cette nouvelle terminologie tout au long de ce manuscrit.

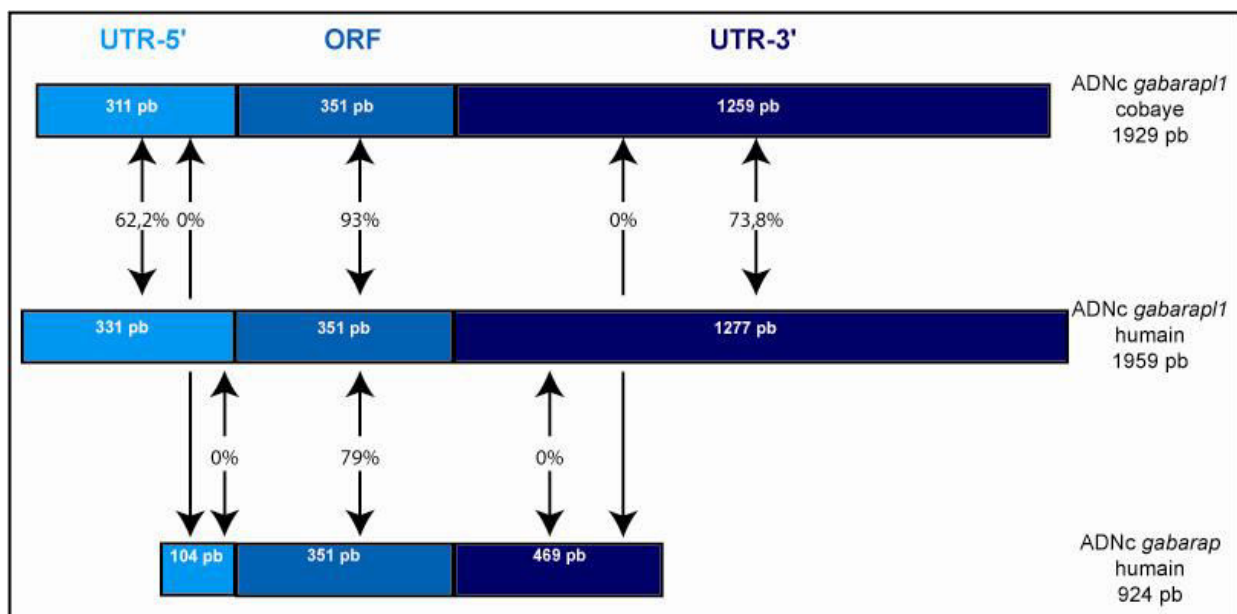


Figure 2 : Comparaison des séquences des ADNc de *gabapapl1* de cobaye et humain et de l'ADNc de *gabapap* humain. Les pourcentages d'identité entre ces séquences sont représentés. ORF : Open Reading Frame ; UTR : UnTranslated Region.

2)-Expression et régulation du gène *gabap11*

2.1)-Expression du gène *gabap11*

L'absence d'identité de séquence entre les régions UTR-3' des gènes *gabap11* et *gabapap* a permis la synthèse de sondes spécifiques pour l'étude de leur expression dans différents tissus humains (Nemos *et al.*, 2003). Une étude effectuée par northern-blotting et macroarray sur 76 tissus humains, comprenant 61 tissus normaux, 8 lignées cancéreuses et 7 tissus fœtaux, a révélé que les gènes *gabap11* et *gabapap* sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus normaux avec une forte expression du gène *gabap11* dans le cœur, le placenta, le pancréas, les glandes salivaires, les leucocytes périphériques et particulièrement dans le système nerveux central (paragyrus du cortex cérébral, lobe temporal, putamen et pons). Par contre, *gabapap* est plus fortement exprimé dans le système endocriné et plus particulièrement dans les testicules, les glandes surrénales, la glande thyroïde et l'ovaire. D'autre part, cette étude a démontré pour la première fois que les deux gènes *gabapap* et *gabap11* sont très faiblement exprimés dans les tumeurs et la plupart des tissus fœtaux. Une autre étude ayant pour but l'étude de l'expression des gènes de l'autophagie (*Atg*) par RT-PCR à partir de 16 tissus adultes et 8 tissus fœtaux a montré que le gène *gabap11* est exprimé à un niveau comparable dans les tissus fœtaux étudiés, alors qu'il est exprimé de manière différentielle dans les tissus adultes (Kusama *et al.*, 2009). Chez la souris, Xin et collaborateurs ont montré que *gabap11* est plus fortement exprimé dans le cerveau, le rein, le testicule et le cœur (Xin *et al.*, 2001). Le messenger *gabap11* de cobaye est, quant à lui, principalement exprimé dans le foie, l'endomètre et le poumon (Vernier-Magnin *et al.*, 2001).

La caractérisation de l'expression de *gabap11* et l'établissement d'une cartographie dans le système nerveux central ont été réalisés au sein de notre laboratoire par RT-PCR et hybridation *in situ* grâce à des amorces et des sondes spécifiques du gène *gabap11*. Ces études ont montré que *gabap11* est le gène de la famille *gabapap* le plus exprimé dans le cerveau de rat adulte avec une prédominance dans le tronc et le diencéphale. On retrouve ensuite *lc3*, puis *gabapap* et enfin *gate16* (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006b). La cartographie d'expression de *gabap11* a montré, quant à elle, que le gène s'exprime dans toutes les zones du cerveau de rat depuis le bulbe olfactif jusqu'au cervelet et la moëlle épinière et uniquement dans les neurones. Cette étude a aussi montré que le messenger *gabap11* est plus particulièrement exprimé dans des neurones impliqués dans les fonctions somesthésiques, motrices et neuroendocrines et moins exprimé dans les neurones à fonctions sensorielles

(Tolle *et al.*, 2008). *Gabarapl1* est également fortement exprimé dans les neurones à GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*) localisés dans l'hypothalamus et décrits pour leur implication dans le contrôle de la libération des hormones LH (Hormone lutéinisante) et FSH (Hormone folliculo-stimulante) (Malyala *et al.*, 2005; Mansuy *et al.*, 2009).

2.2)-Régulation de l'expression du gène *gabarapl1*

Le gène *gabarapl1* présente une régulation spécifique selon les tissus. Il est le seul membre de la sous-famille *gabarap* à être régulé par les estrogènes à la fois dans des cellules de cobaye et dans le système nerveux central (Malyala *et al.*, 2004; Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Il est également régulé par les facteurs de transcription FOXO (*Forkhead box transcription factors of O class*) et son expression varie en fonction de l'horloge biologique.

a)-Régulation par les estrogènes

Les estrogènes et en particulier l'estradiol 17- β (E2) sont des hormones féminines impliquées dans plusieurs processus tels que la croissance et le développement du système reproducteur masculin et féminin, la prolifération et la différenciation des cellules ainsi que la mort cellulaire (Lubahn *et al.*, 1993; Ogawa, 1998). Elles sont liées au développement de plusieurs pathologies comme le cancer du sein, de l'utérus et de la prostate (Castagnetta *et al.*, 2004; Harkonen & Makela, 2004; Platet *et al.*, 2004) et agissent également sur le système cardiovasculaire, le système nerveux central et l'homéostasie osseuse (Ascenzi *et al.*, 2006; Vasudevan & Pfaff, 2008). Généralement, les estrogènes régulent l'expression de gènes cibles *via* leur interaction avec des récepteurs aux estrogènes (RE) nucléaires RE α ou β mais peuvent également se lier à des récepteurs membranaires (Bjornstrom, 2005; Klinge, 2001). Les récepteurs aux estrogènes nucléaires peuvent se lier à des co-activateurs ou co-répresseurs et réguler l'expression des gènes cibles mais interagissent également avec des facteurs de transcription tels que le facteur SP-1, le dimère FOS/JUN et les facteurs CREB/CREM/ATE (Gaub *et al.*, 1990; Sabbah *et al.*, 1999; Sugawara *et al.*, 2004b).

Le gène *gabarapl1* a été initialement identifié comme un gène régulé positivement et précocement par les estrogènes et particulièrement par l'estradiol 17- β dans des cellules de cobaye (E2) (Pellerin *et al.*, 1993). Il est également régulé par les estrogènes dans le système nerveux central. En effet, Malyala et collaborateurs ont mis en évidence, par microarray, une régulation positive de *gabarapl1* par les estrogènes dans l'hypothalamus de cobaye (Malyala *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'étude du promoteur et des séquences cis-régulatrices potentielles du gène *gabapap11* de cobaye a été effectuée au laboratoire. Des cellules d'ovaire de Hamster chinois (CHO) ont été transfectées par différentes constructions plasmidiques contenant le gène rapporteur de la luciférase sous la dépendance de différentes formes plus ou moins tronquées d'un fragment de 1538 pb comportant les séquences promotrice et régulatrice du gène *gabapap11* de cobaye (Vernier-Magnin *et al.*, 2005). D'autres constructions contenant des délétions spécifiques au niveau des éléments de réponse ERE et CRE (*Cyclic AMP Response Element*) potentiels ont également été utilisées. Les résultats obtenus ont montré que l'élément initiateur INR correspond au site d'initiation de la transcription et qu'il est responsable de l'activité basale du promoteur (Figure 3). De plus, il a été montré que la réponse transcriptionnelle à E2 nécessite l'expression du récepteur aux estrogènes RE α mais pas de RE β . Le récepteur RE α , activé sous forme de dimère, se lie à un site ERE identifié par analyse informatique dans le premier exon du gène en position + 36. D'autres sites potentiels pour l'action des récepteurs aux estrogènes ont également été identifiés lors de l'analyse bioinformatique des séquences régulatrices du gène de cobaye : deux sites AP-1 (*Activator Protein-1*), un site SP-1 (*Promotor-Specific transcription factor-1*), et un demi ERE (Vernier-Magnin *et al.*, 2005) (Figure 3).

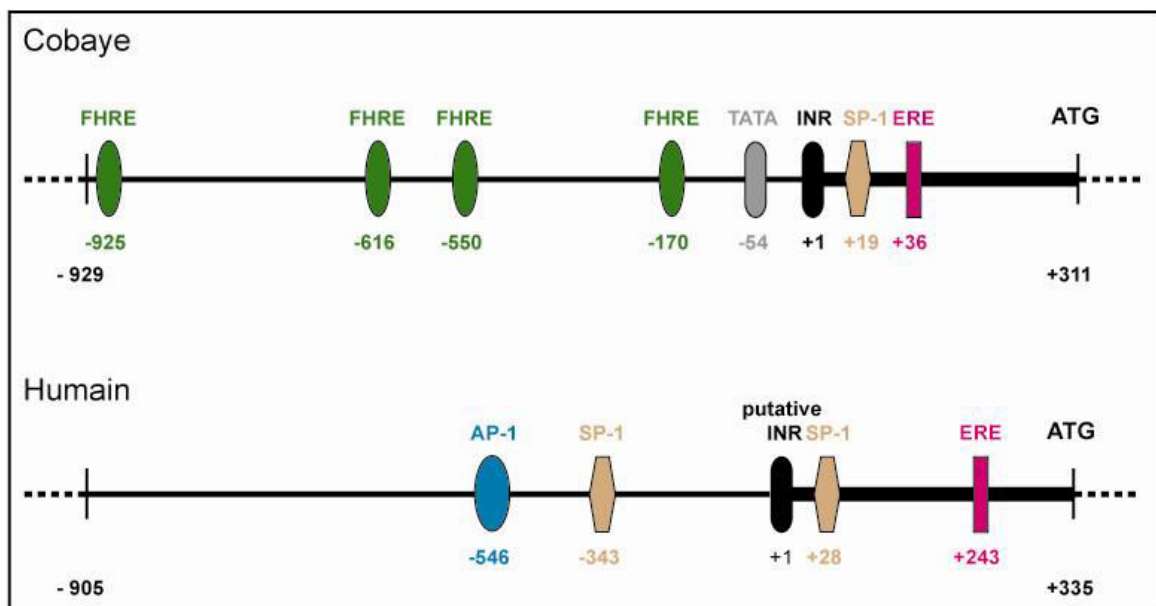


Figure 3 : Séquences régulatrices du gène *gabapap11* humain et de cobaye. AP-1 : site de liaison de la protéine activatrice 1; ERE : élément de réponse aux estrogènes; SP-1 : élément de fixation de la protéine SP-1 ; FHRE : élément de réponse aux facteurs FOXO ; INR : élément initiateur de la transcription ; ATG : codon d'initiation de la traduction. Modifié d'après Legrand, Chakrama *et al.*, 2011.

Afin d'identifier les séquences responsables de la régulation par les estrogènes du gène *gabarapl1* humain, une analyse bioinformatique de la région de 1200 pb en amont du codon d'initiation de la traduction a été réalisée par le logiciel Cister (Frith *et al.*, 2001) ou le programme Matinspector de Genomatix (Cartharius *et al.*, 2005). Cette étude a révélé la présence de plusieurs sites potentiels de liaison des récepteurs aux estrogènes, incluant un ERE, un site SP-1 et un site AP-1 (Figure 3). En revanche, aucun site ERE n'a été retrouvé dans la région homologue des gènes *gabarap*, *gabarapl2* et *lc3*, suggérant ainsi que *gabarapl1* est le seul gène de la famille *gabarap* pouvant être régulé par les estrogènes.

b)-Régulation par les facteurs de transcription FOXO

Les protéines FOXO appartiennent à la famille des protéines *Forkhead* caractérisées par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN très conservé nommé *Forkhead Box*. Cette famille comprend les protéines FOXO1/FKHR (*ForKHead in Rhabdomyosarcomas*), FOXO3/FKHRL1, FOXO4/AFX (*Acute leukemia Fusion gene located in chromosome X*) et FOXO6 (Kaestner *et al.*, 2000). Elles ont été identifiées pour la première fois chez l'homme lors de plusieurs études sur les translocations chromosomiques survenant dans les tumeurs. En effet, les gènes *FOXO* subissent des réarrangements chromosomiques identifiés dans plusieurs tumeurs malignes humaines telles que les leucémies et les rhabdomyosarcomes (Borkhardt *et al.*, 1997; Galili *et al.*, 1993; Parry *et al.*, 1994). Ces protéines sont impliquées dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires physiologiques tels que le métabolisme, la survie, la mort cellulaire programmée, la réponse à différents stress, la prolifération et la différenciation cellulaires, l'homéostasie et le vieillissement (Greer & Brunet, 2005; Huang & Tindall, 2007; Salih & Brunet, 2008). Elles s'expriment de manière différentielle selon les tissus. Par exemple, FOXO1 est particulièrement abondante dans le tissu adipeux, FOXO3 est fortement exprimée dans le cerveau, FOXO4 est préférentiellement exprimée dans le cœur alors que FOXO6 est fortement exprimée pendant le développement du cerveau chez l'embryon (Furuyama *et al.*, 2000; Jacobs, 2003).

Tous les membres de la famille FOXO possèdent un domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) très conservé grâce auquel ils se lient à leur séquence cible, FHRE (*Forkhead response element*), définie comme la suivante : (G/C) (T/A) AACAA (Furuyama *et al.*, 2000; Xuan & Zhang, 2005). Les facteurs FOXO régulent les gènes cibles de manière directe en se liant au FHRE présent au voisinage de ces gènes mais peuvent également se lier à des co-répresseurs ou co-activateurs et notamment avec des acétylases et déacétylases (Calnan & Brunet, 2008). Une analyse bioinformatique a montré que le gène

gabarapl1 de souris possède trois séquences consensus cibles de FOXO3 dans la région de 5 kb en amont de l'ATG (Zhao *et al.*, 2007). Le gène *gabarapl1* de rat possède également des séquences consensus reconnues par les facteurs FOXO1 et 3 (Sengupta *et al.*, 2009). L'analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques des gènes *gabarapl1* de cobaye et humain a révélé l'existence de quatre sites potentiels de liaison des facteurs FOXO dans le gène de cobaye mais aucun site de liaison n'a été retrouvé dans la région homologue étudiée du gène humain (Figure 3).

L'activité transcriptionnelle des facteurs FOXO est régulée en réponse à plusieurs stimuli externes tels que la stimulation par l'IGF (*Insulin Growth Factor*) ou le stress oxydatif (Calnan & Brunet, 2008). Cette régulation se fait par l'intermédiaire de plusieurs modifications post-traductionnelles des facteurs FOXO, phosphorylation et monoubiquitinylation, qui régulent la localisation cellulaire des facteurs modifiés. En effet, l'établissement de la structure cristalline des facteurs FOXO a permis d'identifier de potentiels sites de phosphorylation au niveau de leur DBD (Tsai *et al.*, 2007). En réponse à l'insuline et à différents facteurs de croissance, les facteurs FOXO sont phosphorylés par plusieurs kinases telles que AKT (*AKr T cell lymphoma*), SGK (*Serum and Glucocorticoid-induced Kinase*) et CDK2 (*Cyclin-Dependent Kinase 2*) (Huang & Tindall, 2007). La phosphorylation de FOXO induit leur interaction avec la protéine chaperonne 14-3-3 qui active leur transport hors du noyau, leur séquestration dans le cytoplasme et donc l'inhibition de leur activité transcriptionnelle (Brunet *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2006; Obsilova *et al.*, 2005). En revanche, en réponse à un stress oxydatif et nutritionnel, les facteurs FOXO sont phosphorylés par les kinases MST1 (*Mammalian Ste20-like kinase*), JNK (*JUN-N-terminal Kinase*) et AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Calnan & Brunet, 2008; Chiacchiera & Simone, 2010) qui inhibent leur association avec la protéine 14-3-3 puis leur relocalisation dans le noyau où ils induiront la transcription de leurs gènes cibles.

La polyubiquitinylation des facteurs FOXO1 et 3 dans le cytoplasme, après leur exclusion du noyau, entraîne leur dégradation par le protéasome (Matsuzaki *et al.*, 2003). En revanche, la monoubiquitinylation du facteur FOXO4, en réponse au stress oxydatif, induit sa relocalisation dans le noyau et son activité transcriptionnelle (van der Horst *et al.*, 2006).

Très récemment, Sengupta et collaborateurs ont décrit la régulation du gène *gabarapl1* par FOXO1 et FOXO3 *in vitro* et *in vivo* dans des cellules musculaires cardiaques. Pendant la déprivation en glucose de cardiomyocytes néonataux de rat, les facteurs de transcription FOXO1 et FOXO3 endogènes sont déphosphorylés et relocalisés vers le noyau où ils se lient à leurs séquences cibles au niveau des régions promotrices de différents gènes, et notamment

du gène *gabap11* et des gènes de l'autophagie tels que *lc3* et *atg12*. De plus, la surexpression des facteurs FOXO1 et FOXO3 dans des cardiomyocytes de rat induit les mêmes effets que ceux observés pendant la déprivation en glucose. La régulation de *gabap11* par les facteurs FOXO a également été étudiée *in vivo* chez des rats placés en carence nutritionnelle. Dans ces conditions, l'activité transcriptionnelle de FOXO1 et 3 est activée dans le cœur de ces rats et il est observé une induction de l'expression des gènes *gabap11*, *lc3* et *atg12*. Ces résultats suggèrent donc le rôle des facteurs FOXO1 et 3 dans la régulation de l'autophagie dans les cardiomyocytes de rats (Sengupta *et al.*, 2009). Sengupta et collaborateurs ont également décrit un rôle cardioprotecteur des facteurs FOXO1 et FOXO3. En effet, l'induction d'un stress oxydatif provoque la relocalisation des protéines FOXO dans le noyau et l'activation des gènes cibles. Au contraire, l'inhibition de l'expression de ces mêmes facteurs induit une augmentation de la quantité des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules et la mort cellulaire. Dans cette étude, des souris déficientes en FOXO1 et 3 ont été utilisées. Ces souris présentent plusieurs zones d'infarctus, ainsi qu'un risque élevé d'ischémie et reperfusion (I/R) cardiaques. L'expression des gènes de l'autophagie et des gènes anti-apoptotiques a été évaluée, dans ces souris déficientes en FOXO1 et 3, suite à des dommages aigus du muscle cardiaque. Cette étude a révélé que l'expression de *gabap11*, de *lc3* et des gènes anti-apoptotiques est diminuée dans le cœur des souris déficientes en FOXO suite à une I/R. Ces résultats montrent que l'induction de l'expression de *gabap11* et des autres gènes de l'autophagie durant l'ischémie et la reperfusion du muscle cardiaque est dépendante des facteurs FOXO, suggérant ainsi que l'autophagie induite par les facteurs FOXO est essentielle à la survie des cardiomyocytes suite à des dommages oxydatifs (Sengupta *et al.*, 2011).

Une étude visant à déterminer les gènes régulés lors de l'atrophie du muscle squelettique a été effectuée par microarray. Lors de cette étude, plusieurs gènes régulés positivement ont été identifiés parmi lesquels *gabap11* et *lc3* (Lecker, 2004). D'autre part, il a été montré que la surexpression de FOXO3 dans le muscle squelettique régule de manière positive l'expression de *gabap11*, *lc3*, *beclin1* et d'autres gènes de l'autophagie tels que *Bnip3*, *Bnip3l* et *Vps34* (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). En revanche, l'expression de *gabap11* et d'autres gènes de l'autophagie est régulée négativement dans le foie de souris en hyperinsulinémie et dans des hépatocytes suite à un traitement par l'insuline. De plus, la surexpression du facteur FOXO1 semble inhiber les effets de l'insuline sur la répression de l'expression de *gabap11* et des autres gènes de l'autophagie étudiés (Liu *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré que les gènes *gabap11*, *gabapap* et *gabap12* sont

régulés positivement lors de l'inhibition de la croissance des cellules de cancer colorectal (CRC). En effet, l'inactivation prolongée de la kinase p38 α inhibe la croissance des cellules CRC et permet la relocalisation du facteur FOXO3 dans le noyau sous la dépendance de sa phosphorylation par l'AMPK, ce qui induit l'activation de ses gènes cibles tels que *gabarapl1* (Chiacchiera *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'expression de *gabarapl1* et celle de certains gènes de l'autophagie (*lc3*, *Atg12* et *Atg4b*) est également régulée positivement *in vitro* et *in vivo* dans des cellules du muscle squelettiques de truites arc-en-ciel en carence nutritionnelle. Cependant, la phosphorylation du facteur FOXO3, suite à une stimulation par l'IGF, n'induit pas de forte diminution de l'expression des gènes de l'autophagie chez la truite (Seiliez *et al.*, 2010).

c)-Régulation durant les rythmes circadiens

Le rythme circadien est un rythme biologique caractérisé par des oscillations d'environ 24 heures. Les éléments régulés durant le rythme circadien présentent donc un pic d'expression maximum puis un pic d'expression minimum (Dunlap, 1999). Chez les mammifères, ces oscillations sont générées par le noyau suprachiasmatique (SCN), localisé dans l'hypothalamus, et considéré comme le régulateur de l'horloge biologique et de l'expression des générateurs d'oscillations intracellulaires (Reppert & Weaver, 2002). Le rythme circadien est connu pour moduler l'axe reproducteur et particulièrement la durée de libération de la gonadotrophine dans les neurones (Boden, 2006; Kennaway, 2004). Le rythme circadien est également observé dans plusieurs organes périphériques tels que le foie, le cœur, le rein ou le pancréas. On retrouve, dans ces organes, des générateurs d'oscillations circadiennes qui sont en liaison avec le noyau suprachiasmatique et qui permettent leur synchronisation (Yamazaki *et al.*, 2000; Zylka *et al.*, 1998).

Le rythme circadien est régulé dans le noyau suprachiasmatique par un ensemble de rétrocontrôles négatifs ou positifs des gènes impliqués. Parmi ces acteurs moléculaires majeurs participant au rythme circadien, on trouve les protéines CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) et BMAL1 (*Brain and Muscle ARNT-Like Protein 1*) (Reppert & Weaver, 2002). Après leur synthèse dans le cytoplasme, ces deux protéines forment un hétérodimère et sont redirigées vers le noyau où elles se lient à leurs régions cibles, appelées E-BOX (CACGTG), localisées dans les régions promotrices des gènes circadiens *per1* et *per2* (*period 1* and *2*) et des gènes cryptochromes *cry1* et *cry2* permettant ainsi leur activation (Munoz *et al.*, 2002).

Les protéines PER et CRY exercent un rétrocontrôle négatif sur leur propre expression. Ainsi, ces deux protéines sont relocalisées dans le noyau, lorsqu'elles sont phosphorylées par la kinase caséine 1 ϵ , où elles interfèrent avec l'hétérodimère CLOCK/BMAL1 pour inhiber leur propre transcription (Jin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999). La régulation négative de la rythmicité est également effectuée par l'intermédiaire d'autres acteurs moléculaires telles que les protéines REV-ERBa (*Reverse orientation c-ERB A-1*), ROR (*Retinoid acid related Orphan Receptor*), DEC1 (*Differentiated Embryo Chondrocyte 1*) et DEC2 (*Differentiated Embryo Chondrocyte 2*) elles mêmes régulés par CLOCK/BMAL1. Les protéines REV-ERBa et ROR répriment la transcription du gène *bmal1* tandis que les protéines DEC1 et DEC2 forment un hétérodimère non fonctionnel avec la protéine BMAL1, empêchant ainsi la formation de l'hétérodimère CLOCK/BMAL1, ce qui conduit à l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans les rythmes circadiens (Honma *et al.*, 2002; Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).

Le rétrocontrôle positif est, quant à lui, médié par la protéine PER2 qui induit l'expression du gène *bmal1* par l'intermédiaire de sites encore inconnus (Shearman *et al.*, 2000).

Dans les organes périphériques de plusieurs espèces, le rythme circadien est régulé par des facteurs externes, le plus étudié étant le régime alimentaire. Il a été démontré que dans les foies de souris nourries seulement pendant la journée, la phase d'expression des gènes de l'horloge biologique (*per1*, *per2*, *per3*, *cry1* et *clock*) est inversée conduisant ainsi à un découplage des oscillateurs circadiens périphériques et du noyau suprachiasmatique (Damiola *et al.*, 2000).

L'expression du gène *gabap11* est régulée durant le rythme circadien. En effet, Mansuy et collaborateurs ont montré, pour la première fois, que le gène *gabap11* est exprimé dans les cellules GnV-3 de rat immortalisées (*Gonadotropin-releasing hormone expressing neurons*) dans lesquelles son expression présente une rythmicité similaire à celle de la protéine CLOCK. Ces oscillations de l'expression de *gabap11* sont observées après un choc sérique (50 %) de deux heures. Afin de mieux comprendre la régulation de *gabap11* au cours du rythme circadien, les auteurs ont effectué les mêmes expériences après inhibition de l'expression du gène *per1* et ils ont montré une diminution de l'expression de *gabap11* d'un facteur 2. Tous ces résultats montrent que l'expression de *gabap11* est rythmique et dépendante de *per1* dans les cellules GnV-3 (Mansuy *et al.*, 2009).

D'autres études ont montré la régulation de *gabap11* au cours du rythme circadien dans le foie de souris. Grâce à des techniques de microarray et northern-blotting, il a été

démonstré que *gabap11* présente un pic d'expression durant le jour et une expression moins importante durant la nuit. L'inhibition du gène *clock* atténue fortement l'expression de *gabap11*. *gabap11* est donc considéré comme un gène régulé positivement pendant la phase de jour dans le foie de souris sous le contrôle du gène *clock* (Sakao *et al.*, 2003).

3)-Expression de *gabap11* dans les conditions pathologiques

3.1)-Lignées cellulaires

Peu d'études ont été menées jusqu'à aujourd'hui sur l'expression des gènes de la famille *gabap* dans des conditions pathologiques. Une première étude a montré que le gène *gabap11*, comme *gabap*, est inhibé dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses : deux lignées de lymphomes de Burkitt (Daudi et Raji), trois lignées cellulaires issues de patients atteintes de leucémies (HL-60, MOLT-4 et K-562), une lignée de carcinome de poumon (A549), une lignée d'adénocarcinome colorectal (SW480) et une lignée cancéreuse dérivée du cancer du col de l'utérus (HeLa) (Nemos *et al.*, 2003). Depuis, il a également été décrit que l'expression du gène *gabap* est diminuée dans des cellules dérivées de cancer du sein (CAL51) (Klebig *et al.*, 2005).

3.2)-Cancer du sein

Au laboratoire, en collaboration avec le Dr. Descotes du CHU Lyon Sud, l'expression du gène *gabap11* a été étudiée dans une large cohorte de patientes (265) atteintes de cancer du sein. Cette étude rétrospective, effectuée par qRT-PCR, a montré que l'expression du gène *gabap11* est significativement diminuée dans les tumeurs de haut grade avec atteinte des ganglions lymphatiques (pN+) et que les patientes dont la tumeur présente le taux le plus élevé de messenger *gabap11* sont celles qui présentent le moins de récurrence métastatique. Ces résultats suggèrent donc que le gène *gabap11* peut être considéré comme un facteur de bon pronostic. Dans la même étude, il a été démontré, par microarray, que *gabap11* est inhibé dans différentes autres tumeurs humaines (rein, testicule, vessie, pancréas et prostate) par rapport aux tissus sains (Berthier *et al.*, 2010).

3.3)-Méningiomes

Une seconde étude préliminaire, réalisée au laboratoire par Fabrice Tolle dans le cadre de sa thèse soutenue en 2008, a porté sur l'expression de *gabap11* dans des méningiomes, des tumeurs bénignes du système nerveux central (Tolle, 2008). Cette étude a été effectuée

sur 50 méningiomes de grade I classés selon leurs caractéristiques histologiques en 4 groupes : fibromateux (MF), transitionnel (MT), méningothélial (MM) et psammomateux (PSA) et 3 méninges saines servant de contrôle. Cette étude a démontré une diminution significative du taux de messenger *gabap11* dans les méningiomes de type psammomateux. De plus, selon les groupes des méningiomes, des différences d'expression ont été observées en fonction du sexe et de l'âge des patientes. En effet, dans les méningiomes transitionnels et méningothéliaux, le taux de messenger *gabap11* détecté est supérieur dans les méningiomes provenant de femmes par rapport à ceux provenant d'hommes alors que l'inverse est observé dans les méningiomes psammomateux. Par ailleurs, les résultats obtenus ont montré que l'expression de *gabap11* diminue avec l'âge des patientes et cette diminution coïncide avec la moyenne d'âge européenne de la survenue de la ménopause. En conclusion, cette étude préliminaire a montré que *gabap11* n'est pas exprimé de manière homogène dans les différents groupes de méningiomes étudiés et qu'une différence est observée en fonction du sexe et de l'âge des patients. Cette diminution d'expression de *gabap11* en fonction de l'âge des patientes pourrait impliquer l'existence d'un lien entre l'état hormonal des patientes et l'expression de *gabap11*.

3.4)-Autres pathologies

D'autres laboratoires ont étudié l'expression de *gabap11* dans différentes pathologies :

1) il a été montré, par microarray et PCR en temps réel, que l'expression de *gabap11* est augmentée dans les cellules mononucléaires périphériques de sang chez des patients atteints du syndrome de fatigue chronique par rapport aux cellules de donneurs sains (Kaushik *et al.*, 2005) ;

2) il a également été démontré, par microarray, que l'expression de *gabap11* est fortement diminuée dans le cortex préfrontal de macaques qui ont subi des injections de MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), une drogue neurotoxique ciblant les neurones dopaminergiques et utilisée dans les modèles animaux pour mimer l'évolution de la maladie de Parkinson (Storvik *et al.*, 2010) ;

3) l'expression de *gabap11* est régulée négativement dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* chez des patients atteints de la maladie de Parkinson (Simunovic *et al.*, 2009).

Il est à noter que l'expression de *gabap* ou *lc3* n'est pas modifiée dans les pathologies décrites ci-dessus.

II-Les protéines de la sous-famille GABARAP

1)-Séquences et structures

La protéine GABARAPL1 appartient à la sous-famille des protéines GABARAP (*GABA_A Receptor-Associated Protein*), une sous famille appartenant à la grande famille des protéines Atg8 (*Autophagy Related Gene 8*). L'autre sous famille est celle des protéines MAP1-LC3 (*Light Chain 3 of Microtubule-Associated Protein 1*). La sous-famille GABARAP comprend les protéines GABARAP, GABARAPL1 (*GABA_A Receptor-Associated Protein Like 1*), GABARAPL2 (*GABA_A Receptor-Associated Protein Like 2*) et GABARAPL3 (*GABA_A Receptor-Associated Protein Like 3*) (Xin *et al.*, 2001). La sous-famille MAP1-LC3 contient, quant à elle, les protéines MAP1LC3A, MAP1LC3B et MAP1LC3C (He *et al.*, 2003) (Figure 4).

L'identité de séquence entre les gènes *gabarap* et *gabarapl1*, décrite précédemment, est maintenue au niveau protéique (Le Grand JN, 2011). Ainsi, l'alignement des séquences protéiques montre que GABARAPL1 présente 100% d'identité avec GABARAPL3, 87% d'identité avec GABARAP et 61% d'identité avec GATE16. Cependant, GABARAPL1 présente un pourcentage d'identité moindre avec les protéines de la sous-famille MAP1LC3 : 35% d'identité avec LC3C, 31 % d'identité avec LC3A, et 29% d'identité avec LC3B (Figure 4).

GABARAPL1	MKFQYKEDHPFEYRKKKEGKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLDKRKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLDDKKKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLHRCVESA KIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFPSSPCGKA AVDPADRCKEVQQIRDQHPSKIPV I IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPV I IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFLPPLDKTKFLVPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKRKAESERIADRFKNRIPV ICEK-AEKSDIPEIDKRYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDES VY <u>G</u> K-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFVN-NVIPPTSATMGQLYQE HHEEDFFLYIAYSDES VY <u>G</u> L-117
GABARAPL2	MW IIRKRIQLPSEKAI FLFVD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEEDGFLYVAYS GENTF <u>G</u> F-117
LC3A	VKI IRRRLQLNPTQAFLLVNQHSMVSVSTPIADIYEQEKDEEDGFLYMVYASQETF <u>G</u> F-125
LC3B	IKI IRRRLQLNANQAFLLVNGHSMVSVSTPISEVYESEKDEEDGFLYMVYASQETF <u>G</u> MKLSV-125
LC3C	LSI IIRSRMVLRAEFYLLVNNKSLVMSATMAEIYRDYKDEEDGFVYMTYASQETF <u>G</u> CLESAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRIMLPPEKAI FIFVN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFYVVTYS GENTF <u>G</u> R-117

Figure 4 : Alignement des séquences des protéines de la famille Atg8. En rouge sont indiqués les acides aminés qui diffèrent de ceux présents dans la protéine GEC1/GABARAPL1. La glycine terminale (position 116, surlignée en bleu), conservée chez tous les homologues, est essentielle lors de l'autophagie pour la conjugaison aux phospholipides membranaires des autophagosomes. D'après Legrand, Chakrama *et al.*, 2011.

Par ailleurs, les structures cristallines des protéines GABARAPL1 (Structural Genomic Consortium, code:2R2Q), GABARAP (Bavro *et al.*, 2002), GATE16 (Paz, 2000) et LC3 (Sugawara *et al.*, 2004a) présentent de très fortes similarités (Figure 5). Elles possèdent, entre autre, deux hélices α en position N-terminale et un domaine central ressemblant à celui de l'ubiquitine. Ces protéines pourraient donc être considérées comme des *Ubiquitin-Like proteins* (UBL) (Coyle *et al.*, 2002).

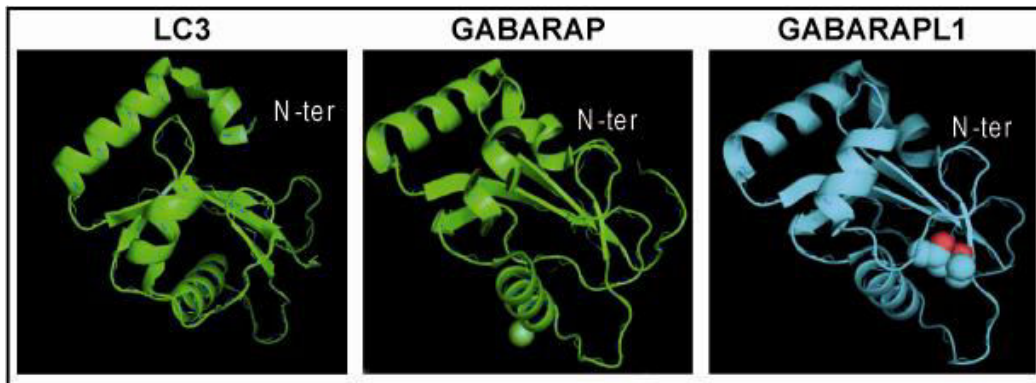


Figure 5: Structures cristallographiques des protéines LC3, GABARAP et GABARAPL1.

2)-Expression et localisation

Etant donné la forte homologie de séquence entre les protéines GABARAP et GABARAPL1, aucun anticorps n'est actuellement capable de discriminer ces deux protéines. Néanmoins, ces anticorps permettent de détecter les deux protéines par western-blotting. En effet, la technique de western-blotting est plus discriminante puisqu'il a été montré que les deux protéines, même si elles ont le même nombre d'acides aminés, ne migrent pas à la même taille en gel SDS-PAGE. En effet, GABARAP migre plus vite que GABARAPL1, ce qui permet de les différencier sur un gel 15 %.

Malgré ces arguments, plusieurs laboratoires ont étudié l'expression ou la localisation des protéines GABARAP et GABARAPL1 dans les cellules ou *in vivo* via l'utilisation d'anticorps polyclonaux. Il faut néanmoins garder en mémoire qu'au cours de ces études, l'expression ou la localisation observée pourrait être liée aux deux protéines homologues. Ces problèmes ont d'ailleurs été soulevés par différents auteurs qui ont décrit une forte réactivité croisée des différents anticorps utilisés. O'Sullivan et collaborateurs, lors de la création des souris *knockout* pour le gène *gabarap*, ont testé plusieurs anticorps dirigés contre GABARAP avant d'en sélectionner un, produit dans leur laboratoire, décrit comme spécifique puisque ne reconnaissant pas GABARAPL1 en western-blotting (O'Sullivan *et al.*, 2005). Wang et

collaborateurs ont, quant à eux, produit un anticorps polyclonal dirigé contre GABARAPL1 mais ont montré qu'il n'est pas spécifique en western-blotting et détecte les deux protéines (Wang *et al.*, 2006).

Cependant, nous pouvons citer les études suivantes qui ont étudié l'expression *in vitro* et *in vivo* de ces protéines. Par exemple, il a été décrit que GABARAP est exprimée dans les cellules pyramidales de l'hypocampe, dans les cellules mitrales du bulbe olfactif et dans les cellules de Purkinje du cervelet de souris (Okazaki *et al.*, 2000). Dans de nombreux neurones, elle co-localise avec ULK1 (*Unc-51-like kinase*), une kinase impliquée dans l'extension des neurites. Ces deux protéines sont co-localisées au niveau du réticulum endoplasmique lisse et de l'appareil de golgi (Okazaki *et al.*, 2000).

L'expression de la protéine GABARAPL1 a été étudiée par la méthode de western-blotting dans différents tissus de rat indiquant une forte expression dans le cerveau et le foie, une expression modérée dans le cœur et le poumon et une très faible expression dans les reins et le muscle squelettique (Wang *et al.*, 2006). L'étude de l'expression dans le cerveau de rat, effectuée par immunohistochimie avec un anticorps polyclonal, a montré que GABARAPL1 est présente dans toutes les régions du cerveau avec une forte expression dans le thalamus, l'hypocampe et l'hypothalamus. GABARAPL1 est exprimée dans les neurones et non dans les cellules gliales et est associée au réticulum endoplasmique et à l'appareil de golgi (Wang *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'expression de la protéine GABARAPL1 a été étudiée lors de défaillances cardiaques chez des patients atteints de cardiomyopathie. Le niveau d'expression de GABARAPL1 et d'autres protéines de l'autophagie (Beclin1, Atg5, Atg12 et LC3) a été évalué avant et après l'implantation d'un dispositif d'assistance mécanique au niveau du ventricule gauche. Les résultats de cette étude montrent que l'expression de GABARAPL1 et celle des autres protéines de l'autophagie diminue dans le tissu cardiaque en réponse aux décharges mécaniques apportées par le dispositif d'assistance. Ces résultats suggèrent que l'autophagie peut être considérée comme un mécanisme de réponse adaptative à certaines cardiomyopathies qui est diminué après utilisation d'un dispositif d'assistance mécanique (Kassiotis *et al.*, 2009).

Pour pallier à ce problème de réactivité croisée des anticorps anti-GABARAPL1, plusieurs auteurs ont eu recours à l'utilisation de protéines de fusion pour lesquelles la détection de la protéine se fait à l'aide d'anticorps dirigés contre les épitopes auxquels GABARAPL1 a été fusionnée. Ces expériences ont permis de déterminer la localisation cellulaire de la protéine, même s'il reste toujours un doute sur la localisation de la protéine endogène du fait de l'utilisation d'épitopes exogènes. Ces études ont montré que

GABARAPL1 présente une localisation cytoplasmique vésiculaire dans les cellules ovariennes d'hamster (CHO) où elle est également associée au réticulum endoplasmique (RE) et à l'appareil de golgi (Chen *et al.*, 2006; Mansuy *et al.*, 2004).

3)-Rôles des protéines de la sous-famille GABARAP

Les protéines de la sous-famille GABARAP ont d'abord été décrites pour leur implication dans le transport intracellulaire de récepteurs mais de récentes études ont suggéré de nouvelles fonctions émergentes pour ces protéines. L'ensemble des partenaires des protéines GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2, connus à l'heure actuelle, sont répertoriés dans le tableau 1.

3.1)-Rôle dans le transport des récepteurs

a)-Transport du récepteur GABA_A

Le récepteur GABA_A (*gamma-aminobutyric acid type A*) est un complexe protéique de 300 kDa formé de 5 sous-unités ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ et ρ). Chaque sous-unité est constituée d'un domaine extracellulaire de liaison au ligand, de quatre domaines transmembranaires et d'un domaine intracellulaire phosphorylable, localisé entre le troisième et le quatrième domaine transmembranaire. Lorsqu'il est activé par le neurotransmetteur inhibiteur GABA_A, un changement conformationnel survient, le canal ionique s'ouvre laissant ainsi passer les ions chlorure et générant un potentiel post-synaptique inhibiteur (Macdonald & Olsen, 1994; Rabow *et al.*, 1995). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de ce récepteur dans la synaptogenèse, la plasticité des synapses inhibitrices (Belhage *et al.*, 1998; Wheal *et al.*, 1998) et dans d'autres processus physiologiques tels que le contrôle de l'excitabilité dans le cerveau (Olsen & Avoli, 1997), les rythmes circadiens (Turek & Van Reeth, 1988), la modulation de l'anxiété, la vigilance, la mémoire et l'apprentissage (Izquierdo & Medina, 1991).

En 1999, Wang et collaborateurs ont décrit que la protéine GABARAP interagit avec la tubuline et les microtubules et que cette interaction nécessite les 22 acides aminés de l'hélice α de la partie amino terminale de la protéine (Wang & Olsen, 2000). D'autre part, ils ont montré que GABARAP interagit avec la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A et que cette interaction est dépendante des acides aminés 36 à 68 (Wang *et al.*, 1999a). Par ailleurs, une étude a montré que la surexpression de la protéine GABARAP dans les cellules COS7 et les neurones d'hippocampe en culture conduit à une augmentation du nombre des récepteurs

GABA_A au niveau de la membrane plasmique (Leil *et al.*, 2004). Il a également été rapporté que la maturation de la protéine GABARAP dans les cellules, qui se traduit par la coupure du dernier acide aminé C-terminal (leucine 117) pour libérer le résidu glycine en position 116, est nécessaire pour son rôle dans le transport de ce récepteur (Chen *et al.*, 2007). Ces résultats démontrent l'implication de GABARAP dans le transport du récepteur GABA_A vers la membrane plasmique des neurones post-synaptiques par l'intermédiaire de son interaction avec le cytosquelette (Figure 6). Par ailleurs, une étude a montré que GABARAP interagit avec la géphyrine, une protéine impliquée dans l'agrégation spécifique du récepteur GABA_A mais incapable de se lier à ce dernier, et que GABARAP est capable de promouvoir le recrutement de la géphyrine à la membrane post-synaptique (Kneussel *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que GABARAP établit l'ancrage du récepteur GABA_A à la géphyrine et participe ainsi à l'organisation de la synapse GABA_Aergique.

Cependant, l'établissement d'une lignée de souris *knockout* pour le gène *gabarap*, n'a révélé aucune différence quant à la localisation et au nombre des récepteurs GABA_A à la surface de la membrane plasmique par rapport aux souris sauvages (O'Sullivan *et al.*, 2005). De plus, l'extinction du gène *gabarap* dans des neurones primaires d'hippocampe de rat par la technique des siRNA n'a induit aucun effet sur le nombre de récepteurs GABA_A à la surface de ces cellules (Marsden *et al.*, 2007). L'ensemble de ces travaux, *in vitro* et *in vivo*, suggère que la protéine GABARAP n'est pas essentielle au transport de ce récepteur ou que d'autres protéines de la même famille se substituent à la protéine GABARAP et participent également à ce processus.

Des expériences de GST-pulldown dans des extraits de cerveau de rat effectuées dans notre laboratoire ont montré que GABARAPL1 interagit également avec la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A et la tubuline (Mansuy *et al.*, 2004). L'interaction de GABARAPL1 avec la tubuline a également été confirmée par résonance plasmonique de surface (Mansuy *et al.*, 2004). Comme pour GABARAP, les 22 premiers acides aminés de la protéine sont nécessaires à cette interaction. Des expériences de turbidimétrie ont montré que GABARAPL1 est capable de promouvoir la polymérisation de la tubuline (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006a; Mansuy *et al.*, 2004). Ainsi, GABARAPL1 se lie au récepteur GABA_A et participe à son transport *via* son interaction avec la tubuline (Figure 6). GABARAPL1 a donc été proposée comme une des protéines qui pourrait se substituer à GABARAP pour le transport du récepteur GABA_A dans les souris *knockout*.

Partenaires identifiés	GABARAP	GABARAPL1	GABARAPL2	Fonctions connues
$\gamma 2$	oui	oui	ND	Agrégation du récepteur GABA _A au niveau de la membrane plasmique
Tubuline	oui	oui	ND	
NSF	oui	oui	oui	Rôle au cours des événements de fusion membranaire
Géphyrine	oui	ND	ND	Agrégation du récepteur GABA _A au niveau de la membrane plasmique
GRIP1	oui	ND	ND	Trafic et agrégation du récepteur GABA _A à la membrane
p130	oui	ND	ND	Assemblage du récepteur GABA _A
PRIP1	oui	oui	ND	Transport du récepteur GABA _A
ULK1	oui	ND	oui	Rôle possible dans l'élongation axonale des neurones
DDX47	oui	ND	ND	Hélicase à ARN responsable de l'épissage du pré-ARNm
Tfr	oui	ND	ND	Passage transmembranaire du fer lié à la transferrine
KOR	oui	oui	ND	Transduction de signaux extracellulaires
PX-RICS	oui	oui	ND	Transport du complexe N-cadhérine/ β -caténine du RE à l'appareil de golgi
Stbd1	oui	oui	oui	Transfert vésiculaire du glycogène aux lysosomes
p62	oui	oui	oui	Dégradation d'agrégats protéiques ubiquitinylés par autophagie
NBR1	oui	oui	oui	Dégradation d'agrégats protéiques ubiquitinylés par autophagie
ARH	ND	oui	ND	Transport intracellulaire, croissance et élongation des axones, endocytose des récepteurs aux LDL
α synucléine	ND	oui	ND	Formation d'agrégats dans les neurones, maladies neurodégénératives
RAB24	oui	ND	ND	Transport vésiculaire et événements de fusion
Chaîne légère de la clathrine	oui	oui	ND	Endocytose du récepteur GABA _A
Protéine P	oui	ND	ND	Réplication du virus BDV (<i>Bovine Virale Diarrhea</i>)
NaPi-IIa	oui	ND	ND	Co-transport du Pi dépendant du sodium
Récepteur AT1	oui	oui	ND	Responsable des actions trophiques et vasoconstrictrices de l'angiotensine II
TRPV1	oui	ND	ND	Transduction de signaux liés à la douleur
Récepteur à la vitamine D	ND	oui	ND	Récepteur nucléaire, impliqué dans plusieurs processus physiologiques et particulièrement dans le métabolisme
Calréticuline	oui	ND	ND	Régulation des voies de signalisation dépendantes du calcium, adhésion cellulaire
NIX	oui	oui	oui	Dégradation des mitochondries endommagées par mitophagie

Tableau 1 : Partenaires des protéines GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 (ND = non déterminé).

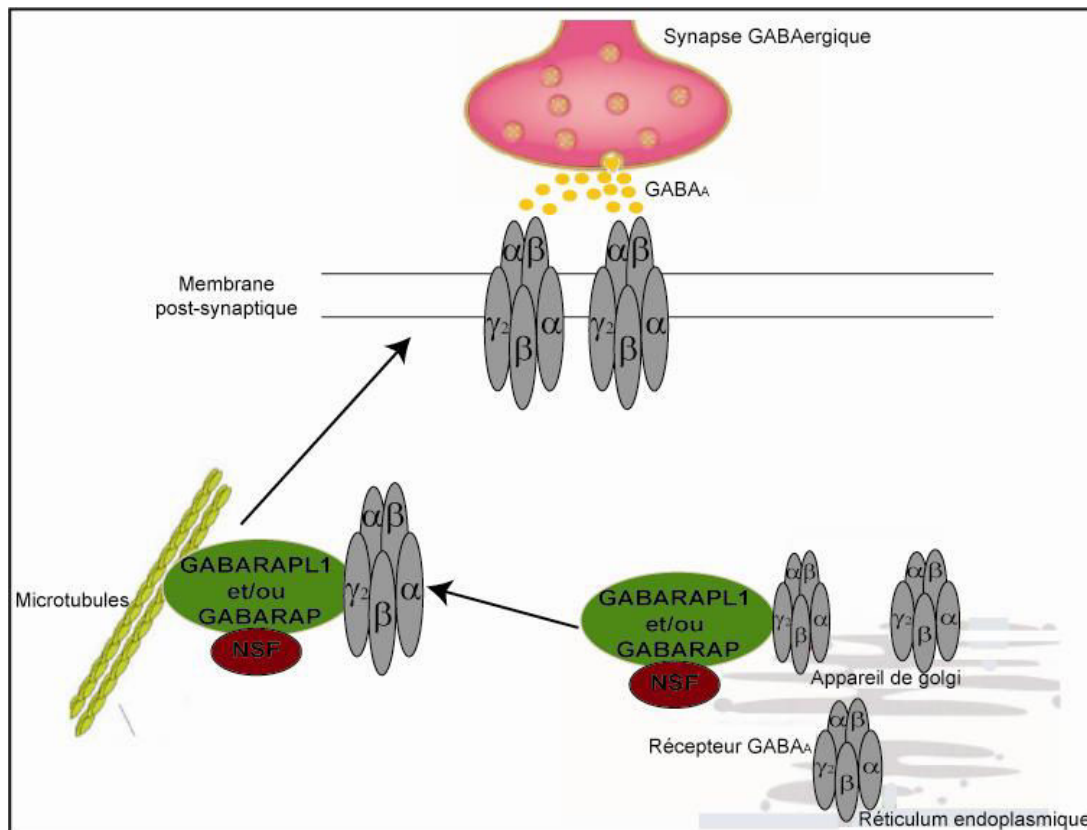


Figure 6: Rôle des protéines de la sous-famille GABARAP dans le transport du récepteur GABA_A. L'assemblage du récepteur GABA_A se fait dans le réticulum endoplasmique, puis les protéines GABARAP et/ou GABARAPL1 transportent le récepteur GABA_A de l'appareil de golgi à la membrane post-synaptique. Les protéines de la sous-famille GABARAP lient la sous-unité γ_2 du récepteur GABA_A et *via* leur interaction avec les microtubules et la protéine NSF, transportent le récepteur GABA_A jusqu'à la membrane. Modifié d'après Tretter *et al.*, 2008 et Kittler *et al.*, 2002.

Une autre étude a décrit que les protéines GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 interagissent avec la protéine NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), une ATP-ase essentielle pour le transport intracellulaire de plusieurs molécules parmi lesquelles on trouve les récepteurs β -adrénergiques et les récepteurs à glutamate de type AMPA (*alpha-amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor*) (McDonald *et al.*, 1999; Rothman, 1994). Le facteur NSF a également été décrit pour être impliqué dans des événements de fusion membranaire (Robinson *et al.*, 1997). GABARAPL2 forme un complexe, avec NSF et la protéine endomembranaire v-SNARE-GOS-28 (*Vesicle-Soluble NSF Attachment protein Receptor-Golgi SNAP receptor complexe member 1*), une protéine spécifique des vésicules golgiennes et qui est impliqué dans le transport des protéines à l'intérieur des saccules de l'appareil de golgi (Sagiv *et al.*, 2000). GABARAPL1 interagit aussi avec le facteur NSF dans des extraits de cerveau de rat et dans des cellules CHO (Chen

et al., 2006). Le rôle physiologique de cette interaction n'est pas encore élucidé mais les auteurs ont suggéré que cette interaction pourrait contribuer au transport de récepteurs neuronaux, incluant celui du récepteur GABA_A, comme cela a déjà été démontré pour la protéine GABARAP (Kittler *et al.*, 2001) (Figure 6).

GABARAPL1 intervient donc dans le transport du récepteur GABA_A *via* son interaction avec la sous-unité $\gamma 2$ et la tubuline. L'interaction de GABARAPL1 avec le facteur NSF contribue probablement au rôle de GABARAPL1 dans le transport du récepteur GABA_A à la membrane plasmique des neurones post-synaptiques.

b)-Transport du récepteur des κ -opioïdes

Le récepteur des κ -opioïdes (KOR) appartient à la famille des rhodopsines, une sous-famille appartenant à la super-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. C'est un récepteur couplé à une protéine G. Il médie les effets des drogues opioïdes et des peptides opioïdes endogènes et est impliqué dans la modulation de plusieurs fonctions dont la nociception, la diurèse et les effets psychomimétiques (Pfeiffer *et al.*, 1986a; Pfeiffer *et al.*, 1986b).

Un criblage par la technique du double hybride a permis la caractérisation de la protéine GABARAPL1 comme un partenaire du récepteur des κ -opioïdes. Dans la même étude, il a été démontré que ce récepteur interagit de manière préférentielle avec GABARAPL1 par rapport aux autres protéines de la sous-famille GABARAP et que GABARAPL1 augmente le nombre de récepteurs à la surface des cellules (Chen *et al.*, 2006). Par ailleurs, des expériences d'immunohistochimie ont montré que GABARAPL1 co-localise avec le récepteur au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi dans les cellules CHO (Chen *et al.*, 2006).

GABARAPL1 interagit donc avec KOR, la tubuline et NSF et active le transport intracellulaire de ce récepteur jusqu'à la surface cellulaire.

GABARAP et GABARAPL2 sont aussi impliquées dans le transport du KOR. En effet, la surexpression de GABARAP et GABARAPL2 dans les cellules CHO entraîne une augmentation du nombre de récepteurs à la surface cellulaire mais avec une efficacité moindre que celle induite par la protéine GABARAPL1 (Chen *et al.*, 2008).

Très récemment, une étude concernant l'effet de la maturation, coupure du dernier acide aminé C-terminal pour libérer la glycine 116, des protéines GABARAP et GABARAPL1 sur leur rôle dans le transport du KOR a été réalisée (Chen *et al.*, 2011). Cette

étude a démontré que la maturation de GABARAPL1 n'a aucun effet sur son rôle dans l'augmentation du nombre de KOR à la surface cellulaire. En revanche, la maturation de GABARAP est nécessaire pour activer le transport de KOR vers la membrane plasmique. Les auteurs ont donc suggéré que la forte interaction de GABARAPL1 avec les KOR est suffisante pour le transport du récepteur mais qu'étant donné la plus faible affinité de GABARAP pour le récepteur, une étape de maturation est nécessaire pour obtenir un transport efficace du récepteur (Chen *et al.*, 2011). Par ailleurs, dans cette étude, les auteurs ont utilisé des siRNA dirigés contre les messagers *gabarap* et *gabarapl1* afin d'étudier l'effet de leur inhibition sur le transport du KOR. Les résultats obtenus ont montré que les siRNA utilisés ne sont pas spécifiques. En effet, ces deux siRNA anti-*gabarap* et anti-*gabarapl1* induisent l'extinction complète de la synthèse de GABARAPL1 mais seulement une légère diminution de la protéine GABARAP. D'autre part, ces résultats ont montré que l'inhibition complète de la synthèse de GABARAPL1 ou qu'une diminution partielle de GABARAP entraîne une diminution du nombre de KOR à la surface cellulaire (Chen *et al.*, 2011).

GABARAP et GABARAPL1 sont deux protéines présentant un nombre important de partenaires communs. De ce fait, elles sont considérées pour beaucoup comme deux protéines redondantes et participant aux mêmes fonctions dans les cellules. Cependant, les travaux réalisés par Chen et collaborateurs ont démontré, d'une part, une différence entre ces deux protéines par rapport à l'effet de leur maturation sur leur rôle dans le transport du KOR (Chen *et al.*, 2011).

c)-Le récepteur AT1 de l'angiotensine II

Les protéines GABARAP et GABARAPL1 ont été identifiées, par la technique du double hybride, comme des protéines partenaires du récepteur AT1 (Angiotensine de type 1) de l'angiotensine II. L'interaction de GABARAP avec ce récepteur a été confirmée par co-immunoprécipitation ainsi que par la technique du BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*). Dans cette étude, il a été montré que GABARAP augmente le niveau et la surface cellulaire d'expression du récepteur AT1, suggérant ainsi que GABARAP se lie et transporte le récepteur AT1 vers la membrane plasmique (Cook *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude concernant l'effet de la maturation de GABARAP dans le transport du récepteur AT1 a montré que le clivage de GABARAP et sa liaison aux membranes n'est pas nécessaire à son rôle dans le transport de ce récepteur (Alam *et al.*, 2010).

d)-Le récepteur TRPV1

Le récepteur TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloïde 1*) est un récepteur à canal ionique activé par des composés de la famille des vanilloïdes. Il est impliqué dans la transduction du signal lié à la douleur. Récemment, il a été rapporté que GABARAP interagit avec TRPV1 dans des cellules rénales et neuronales et augmente son expression ainsi que sa liaison à la tubuline. Ainsi, GABARAP lie TRPV1 et participe à son transport et son ancrage à la membrane plasmique et module donc sa fonction (Lainez *et al.*, 2010).

3.2)-Rôle de protéine chaperonne

a)-Le récepteur des κ -opioïdes

Chen et collaborateurs ont montré que la protéine GABARAPL1 joue le rôle d'une protéine chaperonne au cours du transport du récepteur KOR. En effet, lors de la recherche des acides aminés responsables de l'interaction de GABARAPL1 avec KOR, par la technique du double hybride, ils ont identifié sept acides aminés hydrophobes (Y⁴⁹, V⁵¹, L⁵⁵, T⁵⁶, V⁵⁷ et I⁶⁴) indispensables à cette interaction. Le motif FPXXM présent à l'extrémité C-terminale du récepteur KOR est quant à lui nécessaire pour cette interaction (Chen *et al.*, 2008). De plus, la construction d'un modèle moléculaire structural de la protéine GABARAPL1, basé sur la structure cristalline de son homologue le plus proche GABARAP, a permis de déterminer que les résidus (Y⁴⁹, V⁵¹, L⁵⁵, T⁵⁶, V⁵⁷ et I⁶⁴) nécessaires à la liaison du récepteur KOR forment un domaine hydrophobe à la surface externe de la protéine GABARAPL1. Les auteurs ont donc suggéré que la protéine GABARAPL1 pourrait jouer un rôle de protéine chaperonne pour le KOR lors de son transport (Chen *et al.*, 2008).

GABARAP et GABARAPL2 possèdent également le domaine hydrophobe décrit pour faciliter leur interaction avec la séquence FPXXM du KOR. (Chen *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent donc que ces deux protéines pourraient également avoir un rôle de protéines chaperonnes.

b)-Les récepteurs AMPA et EP3.f

La sous-unité GluR1 (*Glutamate Receptor type 1*) du récepteur AMPA et le récepteur EP3.f (*Prostaglandin E3 receptor*) possèdent également des séquences FPXXM et FPXM, respectivement. Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de GABARAPL1 augmente le nombre de ces récepteurs à la surface des cellules, suggérant ainsi que GABARAPL1 interagit probablement avec ces protéines *via* leur motif FPXXM (Chen *et al.*, 2008).

3.3)-Rôle dans la prolifération cellulaire

Très peu d'études ont été publiées sur l'étude de l'implication des protéines de la sous-famille GABARAP au cours de mécanismes différents du transport intracellulaire de protéines et en particulier de récepteurs.

Une étude effectuée au sein de notre laboratoire a montré que la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS régule positivement la prolifération des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney cells*, cellules embryonnaires de rein humaines) (Seguin-Py, 2007). Il a également été montré que cette augmentation de prolifération n'est pas liée à une diminution de la mort cellulaire mais le mécanisme par lequel GABARAPL1 affecte la prolifération reste encore inconnu.

Par contre, d'autres données obtenues au laboratoire ont montré un effet inverse de la surexpression de GABARAPL1 sur la prolifération des cellules MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) dérivant d'un cancer du sein. En effet, la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans les cellules MCF-7 induit une régulation négative de leur prolifération (Berthier *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré dans notre laboratoire que la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans les cellules MCF-7 diminue leur capacité à former des colonies en agar mou (Seguin-Py, 2011). Ainsi, GABARAPL1 présente certaines caractéristiques d'un gène suppresseur de tumeurs, du moins *in vitro*.

Nous ne pouvons, à l'heure actuelle, expliquer l'effet opposé observé sur la prolifération de ces lignées cellulaires quand nous surexprimons la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS. La seule différence notable est que les cellules HEK293 sont des cellules transformées par l'ADN de l'adénovirus 5 et que les cellules MCF-7 sont dérivées d'un cancer du sein. D'autre part, une étude de Shaw et collaborateurs a montré, lors d'une analyse transcriptomique, que la lignée HEK293 exprime de nombreux gènes spécifiques de cellules neuronales (Shaw *et al.*, 2002). Les auteurs ont confirmé ces données par immunocytochimie et ont montré que ces cellules expriment des protéines neuronales telles que les protéines de neurofilament NF-M, NF-L et à un moindre degré NF-H. Les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle, lors de la transformation des cellules primaires embryonnaires de rein par l'ADN de l'adénovirus 5, les cellules qui ont été préférentiellement transformées ne sont pas des cellules de rein mais des cellules neuronales qui ont été décrites comme étant présentes en très faible quantité dans ce tissu embryonnaire. Ces résultats ont été confirmés dans d'autres lignées transformées par l'ADN des adénovirus 5 ou 12 mais pas dans celles transformées par l'antigène grand T du SV40.

Si les cellules HEK293 sont effectivement des cellules neuronales transformées, cela pourrait expliquer les résultats différents de ceux obtenus avec la lignée de cancer du sein MCF-7. Ces résultats devront donc être confirmés dans d'autres lignées de cancer du sein (MDA-MB231, MDA-MB436, CAL51) ou de lignées d'origine neuronale (SH-SY5Y, SKN-BE).

La protéine GABARAP joue également un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, l'expression de GABARAP dans une lignée cellulaire de cancer du sein, dénommée CAL51, inhibe la prolifération des cellules et leur capacité à former des colonies en agar mou (Klebig *et al.*, 2005). Ces résultats, obtenus dans une autre lignée de cancer du sein, sont donc en accord avec ceux obtenus pour la protéine GABARAPL1 dans la lignée MCF-7.

3.4)-Rôle au cours de l'apoptose

Les protéines GABARAP et GABARAPL1 ont été récemment décrites pour interagir avec plusieurs acteurs de l'apoptose et donc proposées comme des régulateurs potentiels de cette voie de mort cellulaire programmée dite de type I.

Betin et collaborateurs ont notamment montré que GABARAPL1 est maturée dans les cellules par la cystéine protéase appartenant à la famille des protéases Atg4, ATG4D. Cette maturation implique le clivage du dernier acide aminé de la protéine pour libérer la glycine 116 C-terminale. Mais cette maturation de GABARAPL1, démontrée *in vitro*, nécessite le clivage préalable d'ATG4D par la cystéine aspartate protéase, caspase 3. Les auteurs ont également montré que lorsque la forme clivée d'ATG4D est surexprimée dans les cellules, elle est relocalisée dans la mitochondrie où elle induit la mort cellulaire par apoptose. Les auteurs suggèrent ainsi que la protéine ATG4D possède à son extrémité carboxy-terminale un domaine BH3 (*Bcl-2 homology 3*) qui permettrait son recrutement à la mitochondrie et donc son rôle dans l'induction de l'apoptose (Betin & Lane, 2009).

Une deuxième étude a montré que le gène *gabarapl1* est régulé négativement par l'expression du facteur de transcription E2F1, un facteur impliqué dans l'activation de la prolifération cellulaire mais aussi dans l'induction de l'apoptose. En revanche, les gènes *gabarap*, *gabarapl2* et *lc3* sont régulés positivement par ce facteur (Kusama *et al.*, 2009).

Il a également été récemment démontré, par GST-pulldown, que les protéines GABARAP et GABARAPL2 interagissent avec Nix (*Nip-like protein X*) (Novak *et al.*, 2010; Schwarten *et al.*, 2009). GABARAPL1 interagit aussi avec Nix mais de manière plus importante que celle observée pour les deux autres protéines (Novak *et al.*, 2010). Nix est une

protéine contenant un domaine BH3 et de ce fait appartient à la famille des protéines Bcl-2 (*B Cell lymphoma-2*). Nix est localisée à la membrane externe de la mitochondrie et participe à la dégradation spécifique des mitochondries endommagées par autophagie. Nix a été également décrite pour son rôle dans l'induction de l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires (Chen *et al.*, 1999; Yussman *et al.*, 2002).

Enfin, une dernière étude a montré, par co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse et par la technique du double hybride, que GABARAP interagit avec DDX47 (*Dead box polypeptide 47*), une ARN hélicase. Les auteurs ont montré que la co-expression de ces deux protéines dans des cellules cancéreuses induit leur mort par apoptose. Dans cette étude, les auteurs ont montré pour la première fois l'implication d'une protéine de la sous-famille GABARAP dans l'apoptose (Lee *et al.*, 2005).

Ces différents travaux démontrent que les protéines de la sous-famille GABARAP sont des protéines interagissant avec plusieurs protéines jouant un rôle au cours de l'apoptose.

3.5)-Autres rôles des protéines de la sous-famille GABARAP

De nouveaux rôles et fonctions de GABARAPL1 ont été décrits récemment suite à l'identification de nouveaux partenaires de cette protéine.

a)-Transport des lipides

GABARAPL1 est la seule protéine de la sous-famille GABARAP pour laquelle l'interaction avec la protéine ARH a été étudiée (*Autosomal Recessive Hypercholesterolemia*) dans le cerveau de souris. (Mameza *et al.*, 2007). ARH est une protéine adaptatrice des lipoprotéines et est impliquée dans l'endocytose des récepteurs au LDL (*Low density lipoprotein*) médiée par la clathrine (Jones *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent un rôle de GABARAPL1 dans le métabolisme des lipoprotéines dans le cerveau.

b)-Transport du glycogène

GABARAPL1 interagit aussi avec la protéine Stbd1 (*Starch binding domain containing protein 1*), suggérant ainsi qu'elle pourrait avoir un rôle dans le métabolisme du glycogène. Des expériences de localisation cellulaire ont montré que GABARAPL1 co-localise avec Stbd1 et LAMP-1, un marqueur du lysosome. Les auteurs ont suggéré que ces interactions contribueraient au transport du glycogène vers les lysosomes. GABARAP et LC3 interagissent et co-localisent également avec Stbd1 (Behrends *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010b).

c)-Transport du récepteur GABA_A

Une autre étude effectuée dans notre laboratoire a permis de caractériser l'interaction de GABARAPL1 avec PRIP1 (*Phospholipase C-related inactive protein 1*) par GST-pulldown (Cashman 2008). GABARAP interagit également avec les protéines PRIP1 et p130, deux protéines impliquées dans l'assemblage du récepteur GABA_A et dans la régulation de sa fonction inhibitrice *via* leurs rôles dans le transport, la phosphorylation et l'endocytose. La liaison de GABARAP à ces deux protéines facilite son rôle dans le transport du récepteur GABA_A (Coyle & Nikolov, 2003; Kanematsu & Hirata, 2002). De la même manière, la liaison de GABARAPL1 avec PRIP1 pourrait faciliter son rôle dans le transport du récepteur GABA_A.

Avant le début mon doctorat en 2008, il avait été démontré que certaines protéines des sous-familles GABARAP et LC3 (GABARAP, GABARAPL2 et LC3B) jouent un rôle important dans le processus de l'autophagie. Cette fonction différente des rôles décrits ci-dessus sera discutée dans le chapitre suivant et dans le chapitre résultats.

III-L'autophagie

1)-Historique et généralités

L'autophagie est un mécanisme de dégradation cellulaire dont le terme provient du grec *auto* et *phagos* et signifie « se manger soi-même ». Ce terme a été introduit par Christian De Duve lors de la découverte et la caractérisation des fonctions du lysosome, un organe de digestion intracellulaire, qui contient de nombreuses hydrolases actives à pH acide (De Duve & Wattiaux, 1966).

L'autophagie est un processus très conservé de la levure aux mammifères, et également présent chez les plantes (Reggiori & Klionsky, 2002). Cependant, le mécanisme moléculaire et le nombre d'acteurs évoluent avec la complexité des organismes. En effet, l'autophagie a été initialement décrite chez la levure grâce à la découverte des gènes *Atg* (*AuTophaGy-related gene*) dont la dénomination est issue de la nomenclature adoptée pour les eucaryotes supérieurs (Klionsky *et al.*, 2003). La plupart des gènes *Atg* possèdent leur homologue chez les mammifères. Néanmoins, de nombreuses zones d'ombre persistent et de nombreux travaux seront encore nécessaires avant d'appréhender complètement ce processus. Récemment, l'analyse du protéome global de l'autophagie a été réalisée dans des cellules humaines et a permis de caractériser plusieurs centaines de protéines partenaires impliquées dans divers processus. Cette étude a fourni un aperçu global du réseau interactionnel des protéines de l'autophagie et constitue une avancée considérable dans la caractérisation du mécanisme moléculaire de l'autophagie chez l'homme (Behrends *et al.*, 2010).

Trois types de processus autophagiques ont été décrits à ce jour : la microautophagie, l'autophagie dépendante des chaperonnes (*Chaperon-Mediated Autophagy*, CMA) et la macroautophagie. Toutes ces formes d'autophagie ont la même finalité qui est la dégradation irréversible des constituants cellulaires par les enzymes lysosomales. Cependant, la différence entre ces trois formes réside dans la nature des constituants cellulaires dégradés et dans le processus par lequel ces constituants sont acheminés aux lysosomes (Figure 7).

1.1)-La microautophagie

La microautophagie est la forme la moins étudiée de l'autophagie chez les eucaryotes. Elle est caractérisée par la séquestration de portions du cytoplasme par invagination de la membrane du lysosome (Dunn, 1994; Marzella *et al.*, 1981). Cette dégradation est sensible aux variations de pH et à la présence d'inhibiteurs de protéases (Ahlberg *et al.*, 1982). Elle

concerne des organites aussi bien que des protéines solubles à longue ou à courte durée de vie.

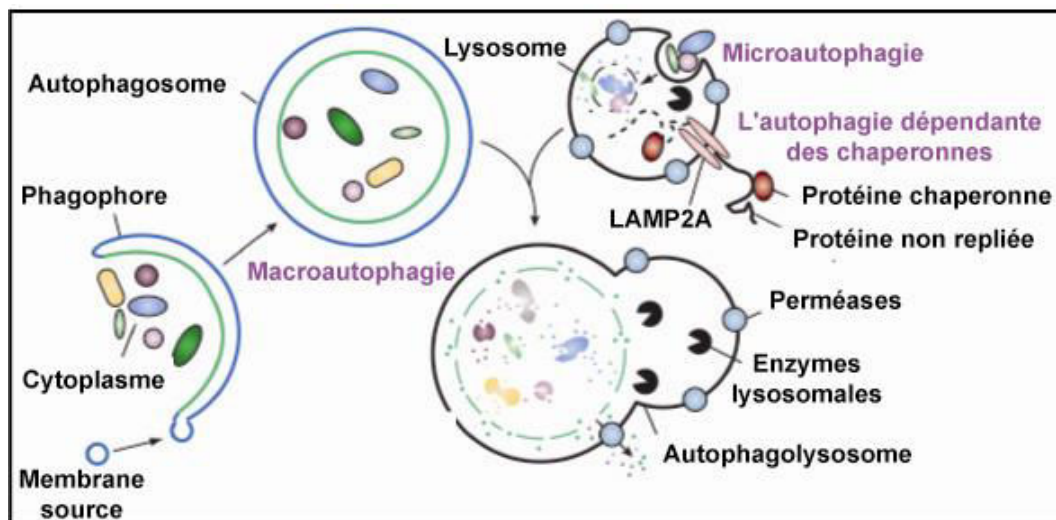


Figure 7 : Trois différentes formes de l'autophagie. Modifié d'après Mizushima *et al.*, 2008.

1.2)-L'autophagie dépendante des chaperonnes ou CMA

La CMA est une forme sélective de l'autophagie présente uniquement chez les mammifères (Cuervo, 2010). Elle est présente à un niveau basal dans certains tissus tels que le foie, le rein et le cœur mais elle est également activée en conditions de stress prolongé. Elle est également induite lors de l'inhibition de la forme majeure de l'autophagie, la macroautophagie, remplaçant alors de manière constitutive cette dernière (Dice, 2007; Kaushik *et al.*, 2008). Une de ses principales différences avec la macroautophagie est sa sélectivité. En effet, la CMA ne dégrade pas d'organites mais uniquement les protéines cytosoliques qui possèdent dans leur séquence le motif pentapeptidique KFERQ (Dice, 1990). Ce motif de ciblage est reconnu par la protéine chaperonne HSC70 puis ce complexe, régulé par plusieurs chaperonnes et co-chaperonnes (Agarraberes & Dice, 2001), transite dans le cytoplasme avant son adressage à la membrane du lysosome où il est reconnu par le récepteur membranaire de la CMA, la protéine LAMP2A (Cuervo & Dice, 1996). Une fois liée à LAMP2A, la protéine substrat dépliée traverse la membrane du lysosome aidée dans ce processus par la forme lysosomique de HSC70 (lys-HSC70) présente dans la lumière du lysosome. La protéine cible est ensuite dégradée par les hydrolases lysosomales (Agarraberes *et al.*, 1997).

1.3)-La macroautophagie

La macroautophagie est la forme principale du processus autophagique. Dans ce manuscrit, nous utiliserons l'appellation générale d'autophagie. A la différence des autres formes, elle est caractérisée par la formation de vésicules intracellulaires appelées autophagosomes. C'est un processus par lequel les eucaryotes dégradent leurs propres constituants cellulaires tels que les protéines à longue durée de vie et les organites comme la mitochondrie. Cette dégradation est dite non sélective ou non spécifique. L'autophagie comporte plusieurs étapes (Figure 8). Premièrement, une étape d'initiation qui implique la formation des phagophores et la séquestration du matériel à dégrader (1). Cette étape est suivie par l'élongation des phagophores jusqu'à la formation d'autophagosomes (2). Une étape de maturation (3) conduit à la fusion des autophagosomes avec les composants du système endomembranaire puis avec les lysosomes. Finalement, ce mécanisme s'achève par la dégradation du contenu vésiculaire par les enzymes du lysosome (4).

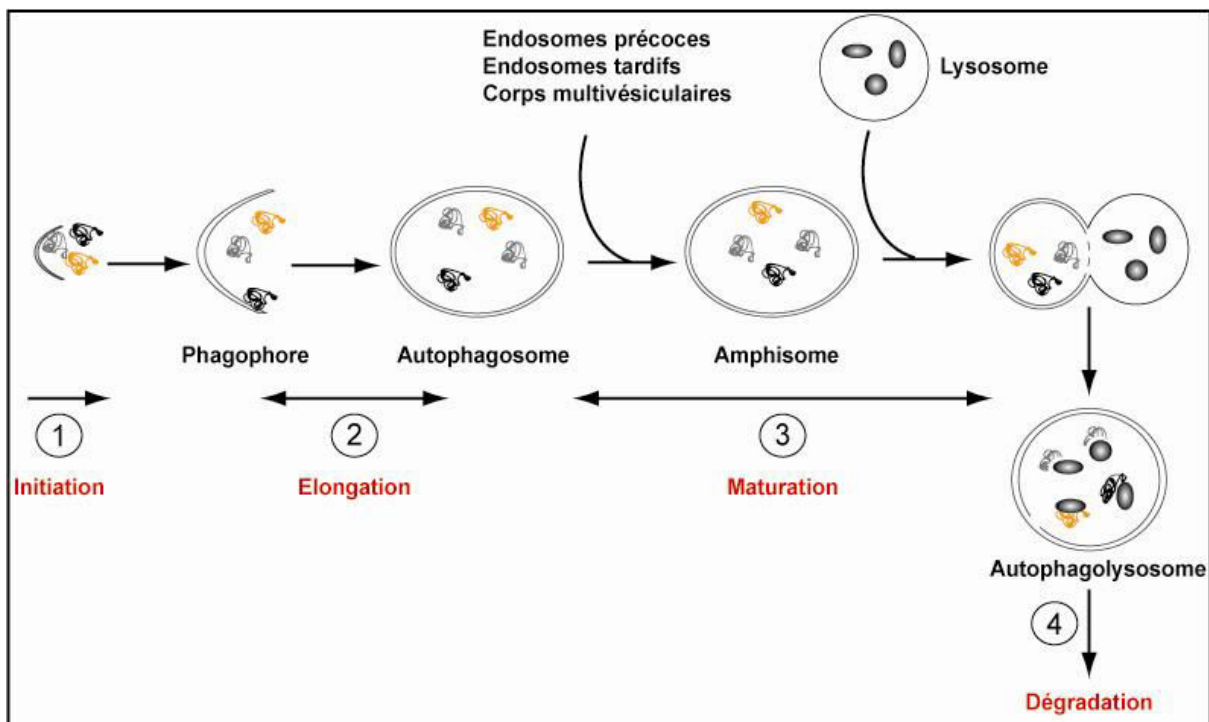


Figure 8 : Les différentes étapes de la macroautophagie. 1 : Initiation qui implique la séquestration du matériel à dégrader à l'intérieur de doubles membranes pré-existantes appelées phagophores. **2 :** Elongation et courbure des phagophores jusqu'à la formation complète de l'autophagosome. **3 :** Maturation qui se traduit par la fusion des autophagosomes avec des constituants du système endomembranaire (endosomes précoces et tardifs ou les corps multivésiculaires) pour donner des amphisomes. Dans un deuxième temps, les amphisomes fusionnent avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes. **4 :** Dégradation des protéines et organites par les enzymes lysosomales. Modifié d'après Maiuri *et al.*, 2007a.

L'autophagie peut être décrite comme sélective lorsqu'elle fait intervenir des protéines connues sous le nom d'adaptateurs de l'autophagie. Les adaptateurs caractérisés à ce jour sont les protéines p62/SQSTM1 (*Sequestosome 1*) et NBR1 (*Neighbour of BRCA1*) (Kirkin *et al.*, 2009; Pursiheimo *et al.*, 2008). p62 est une protéine marqueur de l'activité du flux autophagique puisqu'elle est dégradée spécifiquement par ce processus. Mais cette protéine peut également intervenir en tant qu'adaptateur et induire la dégradation spécifique de substrats cytosoliques *via* sa liaison à des protéines et agrégats ubiquitinylés. Cette interaction fait intervenir son domaine de liaison à l'ubiquitine (UBA, *UBiquitin-Associated domain*). Elle peut également interagir avec les formes liées aux phospholipides des protéines Atg8 *via* son domaine LIR (*LC3-interacting domain*) et ainsi cibler les protéines agrégées ubiquitinylées vers les autophagosomes (Noda *et al.*, 2010; Pankiv *et al.*, 2007). Un défaut du processus autophagique a notamment été décrit pour induire une accumulation de la protéine p62 et est associé à plusieurs maladies telles que les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, Huntington et Creutzfeld-Jacob) (Komatsu *et al.*, 2007; Yue *et al.*, 2009). Très récemment, une différence dans le mode de liaison à la protéine p62 a été décrite entre les protéines de la famille Atg8. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les formes solubles des protéines LC3 et GABARAPL2 lient la protéine p62 alors que seule la protéine LC3 sous sa forme lipidée (LC3-II) lie la protéine p62 et permet son recrutement aux autophagosomes et donc sa dégradation. De plus, les auteurs ont également montré que l'interaction de LC3 à p62 nécessite les acides aminés de l'hélice α N-terminale. Ces résultats suggèrent ainsi que la protéine LC3 est responsable de l'incorporation sélective de p62 dans les autophagosomes et que ce processus est dépendant des acides aminés en position N-terminaux de la séquence protéique de LC3 (Shvets *et al.*, 2011).

Une autre forme d'autophagie sélective a récemment été décrite : la mitophagie (Kim *et al.*, 2007). En effet, la mitochondrie est le siège de la production d'énergie ainsi que des phosphorylations oxydatives. Un des produits générés au cours de ces réactions sont les espèces réactives de l'oxygène qui sont responsables en très grande partie des dommages subis par les mitochondries. Ces mitochondries endommagées produisent alors davantage d'espèces oxygénées libres qui ont été décrites pour jouer un rôle important au cours de plusieurs maladies telles que le cancer et les maladies neurodégénératives (Wallace, 2005). Ainsi, le maintien de l'homéostasie cellulaire implique la dégradation de ces mitochondries endommagées et un de ces processus de dégradation est la mitophagie. Cette dégradation spécifique des mitochondries a été observée dans plusieurs types cellulaires tels que les

hépatocytes (Elmore *et al.*, 2001) et les cellules neuronales (Xue *et al.*, 2001) et semble jouer un rôle important pendant la différenciation des réticulocytes (Zhang *et al.*, 2009a). Plusieurs molécules sont nécessaires à la dégradation des mitochondries par autophagie chez la levure et les mammifères telles que les protéines Uth1, Atg32, BNIP3L (*Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like*), ULK1, et Parkin (Glick *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2010). Chez les mammifères, Nix est localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et est considérée comme un récepteur impliqué dans l'autophagie sélective des mitochondries endommagées. En effet, durant la maturation des réticulocytes, Nix interagit avec les protéines de la sous-famille GABARAP, notamment avec GABARAPL1, et permet le recrutement de ces protéines à la mitochondrie cible, activant ainsi leur incorporation sélective dans les autophagosomes (Novak *et al.*, 2010; Zhang & Ney, 2008).

2)-Mécanisme de l'autophagie

2.1)-Inducteurs de l'autophagie

L'autophagie basale assure l'homéostasie des cellules *via* le renouvellement des protéines et organites et permet le maintien d'un niveau d'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Cependant, l'autophagie est induite dans les cellules en réponse à plusieurs stimuli internes et externes. En effet, l'autophagie est induite en réponse à une carence nutritionnelle, la diminution du taux d'ATP cellulaire, le stress lié au réticulum endoplasmique, les dommages liés à l'ADN et la mitochondrie, l'hypoxie, le stress oxydatif et l'accumulation de protéines malformées. Les infections par des agents pathogènes constituent également une source de stress qui induit l'autophagie (Kroemer *et al.*, 2010). L'autophagie est également stimulée suite à l'inhibition de certains processus biologiques tels que l'apoptose et la dégradation par le protéasome (Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Plusieurs stimuli externes ont été décrits comme des inducteurs de l'autophagie notamment les agents chimiothérapeutiques utilisés pour les traitements des cancers parmi lesquels on peut citer la Rapamycine et le 4OH-Tamoxifène.

2.2)-Mécanisme cellulaire de l'autophagie

Le processus moléculaire de l'autophagie comporte déjà un important nombre d'acteurs (Tableau 2) mais cette liste est toujours en constante évolution et de nombreuses questions demeurent encore à l'heure actuelle. Néanmoins, on peut définir un schéma général de l'autophagie dans les cellules.

Levure	Mammifères	Rôle
Atg1	ULK1	Protéine kinase du complexe d'initiation, cible de mTOR,
Atg13	mAtg13	Protéine du complexe d'initiation, cible de mTOR
Atg17	FIP200	Protéine du complexe d'initiation, essentielle à la stabilité et la phosphorylation d'ULK1 et mAtg13
<i>ND</i>	Atg101	Protéine du complexe d'initiation, essentielle à la stabilité et la phosphorylation basale d'ULK1 et mAtg13
Atg29	<i>ND</i>	Protéine du complexe d'initiation chez la levure
Atg31	<i>ND</i>	Protéine du complexe d'initiation chez la levure
Atg9	mAtg9	Protéine membranaire, transporteur de lipides
<i>ND</i>	Vmp1	Protéine transmembranaire, recrutement de Beclin1 et les composants du complexe PI3Kinase de classe III au phagophore
Atg2	<i>ND</i>	Protéine se liant à Atg18, impliquée dans le complexe Atg9-Atg18-Atg2
Atg18	WIPI-1,2,3,4	Protéine se liant aux PI3P
<i>ND</i>	DFCP1	Protéine se liant aux PI3P
<i>ND</i>	Alfy	Protéine se liant aux PI3P
Atg27	<i>ND</i>	Essentielle au transport d'Atg9
Atg6	Beclin1	Régulateur positif de l'autophagie, protéine du complexe PI3kinase de classe III, suppresseur de tumeur
Atg14	Atg14	Se lie à Beclin1 et active l'autophagie
Vps34	hVps34	PI3 kinase de classe III
Vps38	UVRAG	Participe au complexe PI3kinase de classe III, rôle dans la maturation des autophagosomes
Vps15	p105	Sous-unité régulatrice de la kinase Vps34
<i>ND</i>	Rubicon	Régulateur négatif de la fusion des autophagosomes avec les composants du système d'endocytose
<i>ND</i>	Ambra1	Protéine du complexe PI3kinase de classe III, régulateur positif de l'autophagie
Atg12	Atg12	Protéine conjuguée à Atg5
Atg5	Atg5	Formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16L
Atg16	Atg16L	Détermine le site de conjugaison de LC3
Atg7	Atg7	Protéine activatrice (E1)
Atg10	Atg10	Protéine conjugatrice (E2), active la conjugaison d'Atg12 sur Atg5
Atg3	Atg3	Protéine conjugatrice (E2), active la conjugaison des protéines Atg8 sur un phospholipide
ATG8	LC3/GABARAP/ GABARAPL1/ GABARAPL2	Protéines conjuguées à un phospholipide, essentielles pour l'élongation et la fermeture des autophagosomes
Atg4	Atg4A-D	Autophagines, responsables du clivage des protéines de la famille Atg8
Atg15	<i>ND</i>	Lipase essentielle pour la dégradation des autophagosomes et de leur contenu
Atg22	<i>ND</i>	Protéine vacuolaire, importante pour la dégradation des autophagosomes et de leur contenu

Tableau 2 : Protéines Atg de levure et leurs homologues identifiés chez les mammifères. Modifié de Tanida., 2011.

Sur le plan cellulaire, l'autophagie est initiée en réponse à divers stimuli (paragraphe 2.1) et débute par la séquestration du matériel à dégrader (protéines ou organites) à l'intérieur de doubles membranes pré-existantes dans la cellule appelées phagophores (Figure 8). L'origine de ces phagophores n'est pas encore connue et fait toujours l'objet d'un débat scientifique (Tooze & Yoshimori, 2010). Certaines études décrivent que ces doubles membranes pourraient prendre origine au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, Axe et collaborateurs ont mis en évidence la présence d'un compartiment riche en PI3P (Phosphatidyl-inositol-3-phosphate) au niveau du RE, appelé omégasome, qui semblerait être un bon candidat pour servir d'origine pour les nouveaux phagophores (Axe *et al.*, 2008; Simonsen & Stenmark, 2008). Récemment, un nouvel acteur moléculaire de l'autophagie, Atg14L, a été identifié. Atg14L est localisée au niveau du RE et permet le recrutement du complexe PI3K de classe III nécessaire pour les premières étapes de l'autophagie. Cette découverte renforce donc l'hypothèse selon laquelle le RE serait à l'origine des phagophores (Matsunaga *et al.*, 2010). D'autres équipes ont décrit la mitochondrie et l'appareil de golgi comme sources potentielles des membranes nécessaires à la formation des autophagosomes. En effet, Atg9, la seule protéine transmembranaire présente à la fois au niveau du site de formation des vésicules et au niveau de la mitochondrie et du réseau trans golgien, est supposée jouer le rôle de transporteur de lipides entre les deux sites. Il n'est donc pas à exclure qu'elle peut transporter des membranes de ces compartiments jusqu'au site de formation des vésicules suggérant ainsi que l'appareil de golgi et la mitochondrie pourraient également être une source de membranes pour la formation des vésicules autophagiques (Hailey *et al.*, 2010; He & Klionsky, 2007). La membrane plasmique a également été proposée comme source de membrane pour les phagophores. En effet, des résultats ont montré l'interaction de la protéine Atg16L avec la chaîne légère de la clathrine de la membrane plasmique. De plus, des vésicules ATG16L1 positives ont été retrouvées au niveau de la membrane plasmique ou localisées à proximité des autophagosomes (Ravikumar *et al.*, 2010).

Les phagophores, contenant le matériel cellulaire destiné à être dégradé, vont alors subir une étape d'élongation jusqu'à la formation complète des autophagosomes. Chez les mammifères, les autophagosomes deviennent matures après fusion avec les compartiments d'endocytose (endosomes précoces et tardifs ou corps multivésiculaires) pour donner les amphisomes (Figure 8) (Liou *et al.*, 1997; Razi *et al.*, 2009). Ensuite, ces amphisomes fusionnent avec les lysosomes afin de générer les autophagolysosomes. Finalement, ce processus s'achève par une étape de dégradation qui implique la lyse de la membrane interne

de l'autophagosome et la dégradation de son contenu par les hydrolases du lysosome (Figure 8).

L'essor de l'étude de l'autophagie depuis une vingtaine d'années est due principalement à la découverte dans les années 1990 des gènes de l'autophagie (*Atg*) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Depuis cette époque, une longue liste de gènes *Atg*, dont les homologues ont été décrits chez les eucaryotes supérieurs, a été établie (voir Tableau 2). Ces premières découvertes ont permis de franchir un grand pas dans la recherche de nouveaux effecteurs moléculaires de l'autophagie dans plusieurs organismes tels que *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Mus musculus* et *Homo sapiens*.

3)-Acteurs de l'autophagie

Tout au long de ce manuscrit, je me concentrerai sur le mécanisme et les acteurs décrits à ce jour chez les mammifères (voir figure 12, page 67 et sur une feuille libre). Les différences existantes chez d'autres espèces et en particulier, la levure sont décrites dans la revue éditée par Yang et Klionsky en 2009 (Yang & Klionsky, 2009).

Plusieurs complexes moléculaires interviennent dans la formation des autophagosomes : le complexe Atg1/ULK1, le complexe PI3 kinase de classe III, les deux systèmes de conjugaison Atg12-Atg5 et LC3-Phospholipide et la protéine Atg9 et ses protéines associées (Tanida, 2011; Yang & Klionsky, 2010).

3.1)-Le complexe Atg1/ULK1

Ce complexe est nécessaire à l'induction de l'autophagie. Chez la levure, il comprend la sérine/thréonine kinase Atg1 et les protéines Atg13 et Atg17. Chez les mammifères, deux homologues de Atg1 ont été identifiés, ULK1 et ULK2 (Kuroyanagi *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1999). Le complexe ULK1 ou ULK2 comprend mAtg13 (Hosokawa *et al.*, 2009), la protéine FIP200 (*Focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kD*) (Hara *et al.*, 2008) et la protéine Atg101 (Mercer *et al.*, 2009) (Figure 9).

Ce complexe est régulé négativement par le complexe mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin complex 1*), un complexe multiprotéique qui inclut les protéines mTOR, Raptor (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*), Mlst8/GβL (*Mammalian Lethal with Sec13 protein 8/G protein subunit β Like*), Deptor, et PHRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa*) (Efeyan & Sabatini, 2010). En effet, en conditions riches en nutriments, le complexe

mTORC1 inhibe l'autophagie *via* sa liaison directe avec le complexe ULK1 et la phosphorylation des kinases ULK1 et mATG13. En revanche, en conditions de carence nutritionnelle, ou après traitement par la Rapamycine, le complexe mTORC1 se dissocie du complexe ULK1, ce qui induit la déphosphorylation d'ULK1 et mAtg13 ainsi que l'activation de leur activité kinasique (Ganley *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009). La déphosphorylation d'ULK1 par mTORC1 augmente alors son activité kinasique permettant son autophosphorylation et la phosphorylation de mAtg13 et FIP200 (Mizushima, 2010). Le complexe Atg1/ULK1 activé recrute notamment des protéines Atg nécessaires pour la formation de l'autophagosome tel que le complexe PI3 kinase de classe III (Mizushima, 2010).

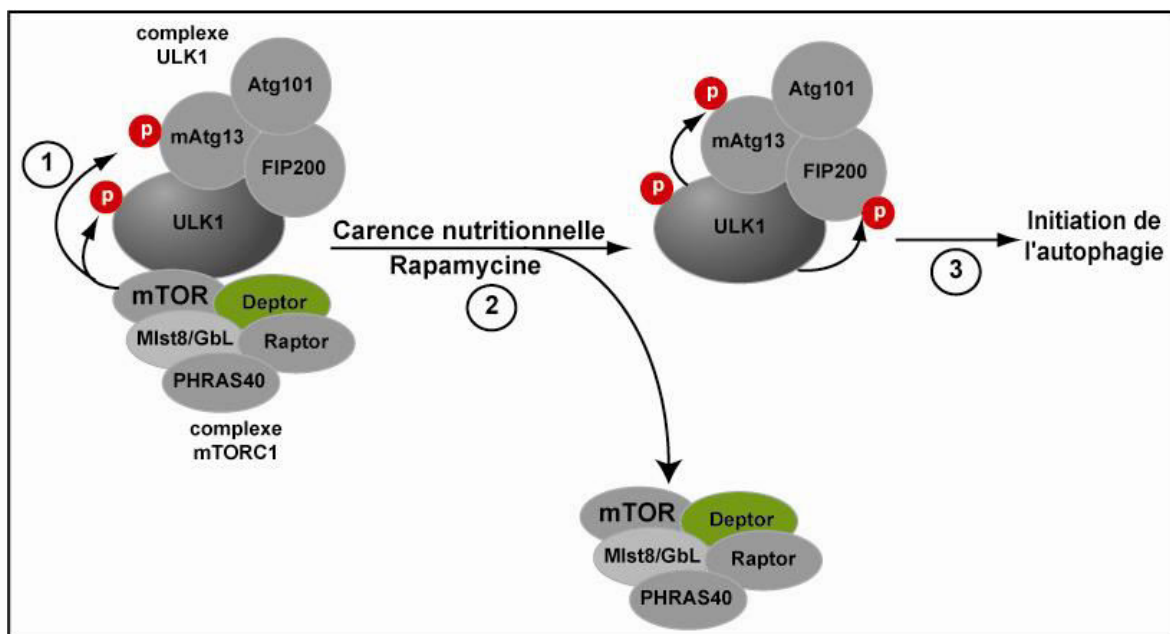


Figure 9 : Régulation du complexe ULK1 par le complexe mTORC1. 1) mTORC1 interagit avec le complexe ULK1 dans les conditions riches en nutriments. 2) Suite à une carence nutritionnelle ou traitement par la rapamycine, le complexe mTORC1 se dissocie du complexe ULK1, ce qui conduit à la phosphorylation de mAtg13 et FIP200 par ULK1 et à son autophosphorylation. 3) Le complexe ULK1, dissocié de mTORC1 et activé par phosphorylation, initie alors l'autophagie. Modifié d'après Kroemer *et al.*, 2010.

3.2)-Le complexe PI3 kinase de classe III

Chez la levure, une seule PI3 kinase existe, la protéine Vps34 qui forme un complexe avec les protéines Vps15, Atg6 et Atg14. Ce complexe est nécessaire à la nucléation des phagophores et à la génération du PI3P, indispensable au recrutement des autres protéines Atg (Yorimitsu & Klionsky, 2005) (Figure 10).

Chez les mammifères, contrairement à ce qui se passe chez la levure deux PI3 kinases existent : la PI3 kinase de classe I et celle de classe III. La PI3 kinase de classe I régule négativement l'autophagie. En revanche, la PI3 kinase de classe III, nommée hVps34, régule positivement l'autophagie et forme un complexe appelé le complexe PI3 kinase de classe III, dans lequel elle interagit avec la protéine p150 (homologue de Vps15) et la protéine Beclin1 (homologue de Atg6) (Kihara *et al.*, 2001; Panaretou *et al.*, 1997) (Figure 10). L'interaction de Beclin1 avec hVps34 est spécifique de l'autophagie et n'affecte aucun autre processus biologique régulé par cette kinase (Furuya *et al.*, 2005). Par l'intermédiaire de l'activité kinasique de la protéine hVps34, ce complexe permet la synthèse de PI3P dont la fonction spécifique n'est pas encore totalement déterminée. Le PI3P produit participe à l'organisation de la membrane et recrute d'autres protéines effectrices telles que la protéine DFCP1 (*Double FYVE domain-containing protein*) (Axe *et al.*, 2008), les protéines de la famille WIPI (*WD-repeated protein interacting with phosphoinositides*) (Polson *et al.*, 2010; Proikas-Cezanne *et al.*, 2007) et la protéine Alfy, qui contient également un domaine FYVE (Simonsen *et al.*, 2004).

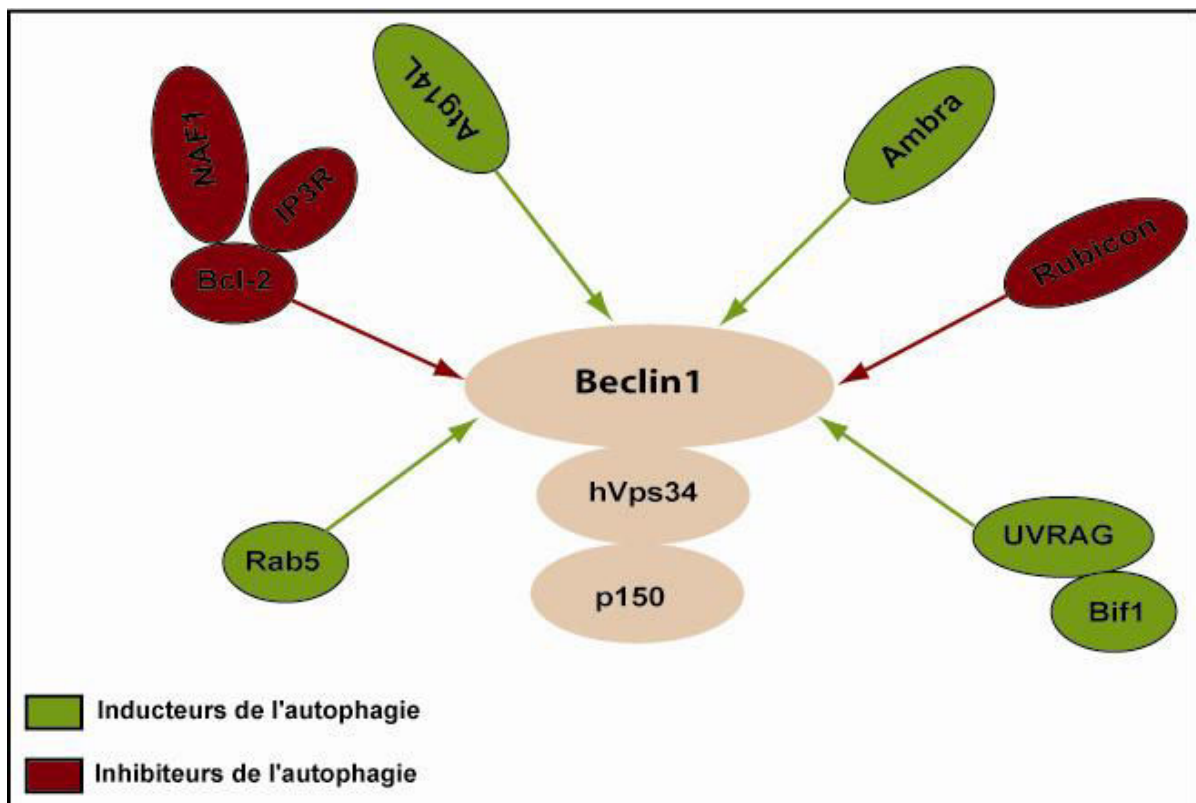


Figure 10 : Composition du complexe PI3K de classe III. En vert sont représentés les partenaires de Beclin1 considérés comme des inducteurs de l'autophagie et en rouge, les inhibiteurs. D'après Ravikumar *et al.*, 2010.

Plusieurs protéines partenaires de Beclin1 ont été décrites comme participant à la régulation de l'autophagie (Figure 10). La protéine Atg14L ou Barkor (homologue d'Atg14) stimule l'activité kinase de hVps34, active la production de PI3P et induit l'autophagie (Matsunaga *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2008). La protéine UVRAG (*Ultraviolet irradiation resistance-associated gene*), homologue de Vps38, est une protéine compétitrice de Atg14L pour sa liaison avec Beclin1 et augmente l'activité kinasique de hVps34 (Itakura *et al.*, 2008). La protéine Bif1 (*Bax-interacting factor 1*) interagit également avec la protéine Beclin1 via son interaction avec UVRAG et active le complexe PI3K. C'est une protéine à domaine N-BAR qui pourrait promouvoir la courbure de la membrane pré-autophagosomale (Takahashi *et al.*, 2007). La protéine Rab5, une petite protéine GTPase impliquée dans l'endocytose, interagit avec hVps34 et l'active (Christoforidis *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2005). La protéine Ambra1 (*Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*), une protéine impliquée dans le développement du système nerveux, interagit avec Beclin1 et active l'autophagie (Fimia *et al.*, 2007). D'autres partenaires de Beclin1 ont été identifiés et régulent négativement l'autophagie telles que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Pattingre *et al.*, 2005) et le récepteur à l'inositol-1,4,5 trisphosphate (IP₃), un récepteur activé par le calcium au niveau du réticulum endoplasmique et qui interagit indirectement avec Beclin1 via son interaction avec Bcl-2 (Vicencio *et al.*, 2009). Une autre protéine du complexe IP₃R, NAF1 (*Nutrient-deprivation autophagy factor 1*) régule négativement l'autophagie via son interaction avec Bcl-2 et la stabilisation de l'interaction Bcl-2-Beclin1 (Chang *et al.*, 2010). L'interaction de Beclin1 avec la protéine Rubicon (*RUN domain protein as Beclin1 interacting and cysteine-rich containing*) inhibe également l'autophagie (Figure 10).

Contrairement à la PI3 kinase de classe III, la PI3 kinase de classe I régule négativement l'autophagie. En effet, la PI3 kinase de classe I génère la formation de PI-3,4-P2 (phosphatidylinositol-3,4-diphosphate) et de PI-3,4,5-P3 (phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphate) à partir des phospholipides PI-4P (phosphatidyl-inositol-4-phosphate) et PI-4,5-P2 (phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate). Les produits issus de cette conversion de phospholipides vont permettre le recrutement à la membrane plasmique de protéines à domaine PH (*Pleckstrine homology*) telles que PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) et AKT-PKB (*AKT-Protein Kinase B*). Ces protéines kinases, lorsqu'elles sont activées, vont activer à leur tour la voie mTOR et donc inhiber l'autophagie (Cantley, 2002).

3.3)-Le système de conjugaison Atg12-Atg5

L'étape d'élongation de la membrane de l'autophagosome nécessite l'intervention de deux systèmes de conjugaison qui sont similaires à ceux décrits pour l'ubiquitinylation et la sumoylation des protéines (Figure 11). Le premier système de conjugaison induit la conjugaison covalente de la protéine Atg12 sur la protéine Atg5 grâce à l'activité de deux enzymes, Atg7 et ATG10. Ces enzymes présentent des activités similaires à celles décrites pour les enzymes activatrice (E1) et conjugatrice (E2) intervenant lors de l'ubiquitinylation des protéines. Atg12 est activée par la protéine Atg7 puis transférée sur la protéine Atg10 et liée par l'intermédiaire de son résidu glycine en position C-terminale à la chaîne latérale d'un résidu lysine interne de la protéine Atg5 (Mizushima *et al.*, 1998).

La formation du complexe Atg12-Atg5 est indispensable au déroulement de l'autophagie et semble s'effectuer de manière constitutive indépendamment de la stimulation de l'autophagie (Mizushima *et al.*, 1999). Par ailleurs, la liaison d'Atg12 à Atg5 se fait directement après leur synthèse rendant la détection des formes libres très difficile. Une fois le complexe Atg12-Atg5 formé, celui-ci se lie de manière non covalente à la protéine Atg16L (*Atg16 Like*) pour former le complexe protéique Atg12-Atg5-Atg16L. La protéine Atg16L s'oligomérisse alors pour induire la formation d'un complexe de haut poids moléculaire, d'environ 800 kD (Mizushima *et al.*, 2003). Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L est localisé à l'extrémité de la membrane externe du phagophore d'où il recrute la protéine LC3 pour sa conjugaison à un phospholipide. Le mécanisme par lequel LC3 est ciblée aux phagophores reste inconnu à ce jour mais une étude a montré que le complexe ATG16L détermine le site de lipidation de LC3 (Fujita *et al.*, 2008b). Les auteurs ont suggéré que suite à l'induction de l'autophagie, le complexe Atg16L se localise au niveau de la membrane des phagophores et recrute la protéine LC3 liée à Atg3, probablement *via* l'interaction d'Atg12 avec Atg3. Une autre étude a montré que le complexe Atg16L possède une activité similaire à celle d'une E3 ligase et active donc la conjugaison de LC3 aux phospholipides (Hanada *et al.*, 2007).

Des données récentes ont décrit une nouvelle forme de l'autophagie qui est indépendante d'Atg5 et Atg7. Durant ce nouveau processus, les autophagosomes sont formés spécifiquement à partir d'endosomes tardifs et du trans-golgi mais n'implique pas la conjugaison de LC3 à un phospholipide. Cependant, ce mécanisme est tout de même régulé par des protéines Atg telles que Atg1 et Beclin1 (Nishida *et al.*, 2009). L'autophagie indépendante d'Atg5 a été observée dans plusieurs tissus embryonnaires et également au cours de la mitophagie intervenant au cours de la maturation des réticulocytes, un processus

durant lequel l'autophagie indépendante d'Atg7 a également été observée (Nishida *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009b).

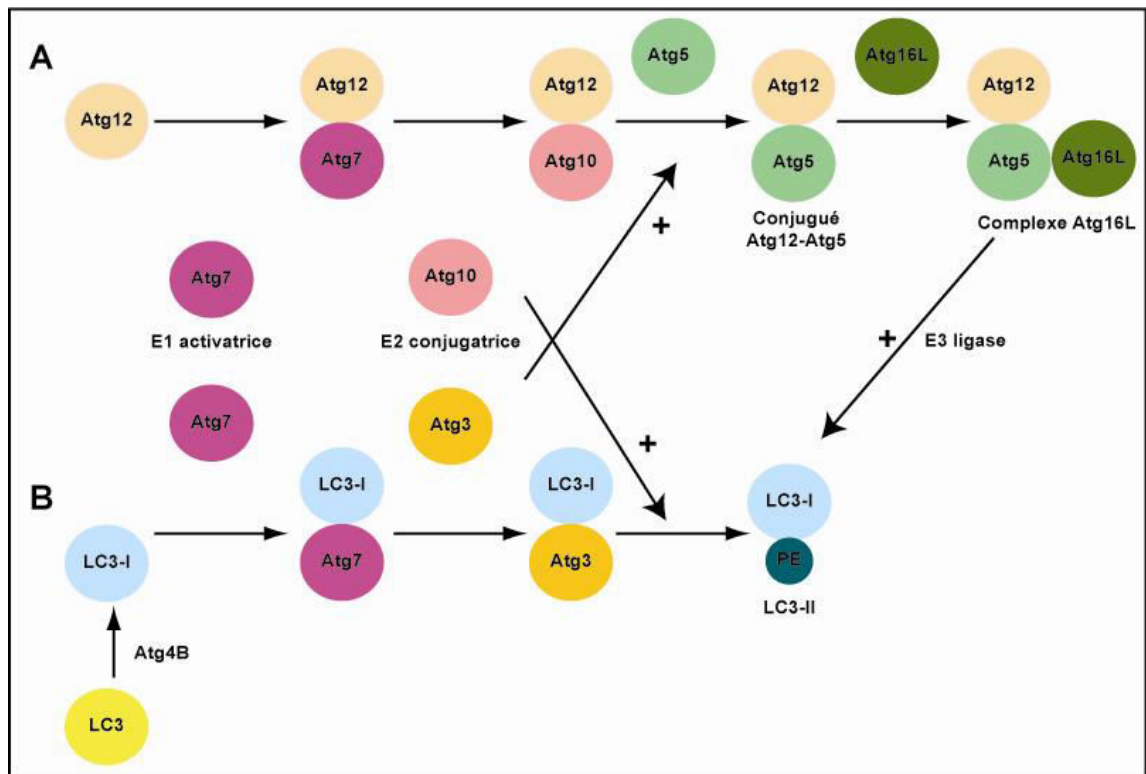


Figure 11 : Les deux systèmes de conjugaison intervenant lors de l'autophagie. A) Le système de conjugaison Atg12/Atg5. Atg12 est activée par Atg7 puis transférée sur Atg10 et finalement conjuguée à Atg5. Le conjugué Atg12-Atg5 forme un complexe avec Atg16L qui joue le rôle d'E3 ligase pour le deuxième système de conjugaison. B) Le système de conjugaison LC3-Phospholipide. LC3 est clivée par Atg4B pour donner la forme mature LC3-I qui est activée par Atg7 puis transférée sur Atg3 et finalement conjuguée à un phospholipide (PE) pour donner la forme lipidée LC3-II. Les protéines conjugatrices Atg3 et Atg10 activent la formation des conjugués Atg12-Atg5 et LC3-PE, respectivement. Modifié d'après Ravikumar *et al.*, 2010.

3.4)-Le système de conjugaison LC3-Phospholipide

La protéine LC3 subit tout d'abord une étape de maturation similaire à celle observée pour son homologue Atg8 chez la levure. En effet, LC3 est clivée par la cystéine protéase Atg4B pour exposer le résidu glycine 116 en C-terminal et donner la forme soluble mature de LC3, LC3-I (Hemelaar *et al.*, 2003; Tanida *et al.*, 2004b) (Figure 11). Durant le processus d'élongation des autophagosomes, LC3-I est liée de manière covalente à un phospholipide pour donner la forme vésiculaire de LC3, LC3-II. Une étude a montré que cette conjugaison à un phospholipide nécessite deux enzymes, Atg7 et Atg3 (Kabeya *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2004c). La conjugaison de LC3 peut s'effectuer sur deux types de phospholipides *in vitro*, une phosphatidylsérine (PS) ou une phosphatidyléthanolamine (PE), alors que des expériences *in*

vivo ont montré une prédominance pour la phosphatidyléthanolamine (Sou *et al.*, 2006). La protéine LC3-II est associée aux faces internes et externes de la membrane de l'autophagosome (Kabeya *et al.*, 2004). Les protéines LC3-II localisées sur la face externe de l'autophagosome sont ensuite délipidées par une cystéine protéase de la famille ATG4 afin de libérer la protéine mature dans le cytoplasme pour un nouveau cycle (Tanida *et al.*, 2004a). Par contre, la fraction de la protéine LC3-II présente sur la face interne de la membrane de l'autophagosome est dégradée avec le contenu de l'autophagolysosome par les hydrolases lysosomales.

Ces deux systèmes de conjugaison sont interconnectés. En effet, comme nous l'avons décrit ci-dessus, le complexe Atg16L est nécessaire à la conjugaison de LC3 à un phospholipide. De plus, il a été rapporté que la protéine Atg10, enzyme de conjugaison de Atg12 sur Atg5, peut interagir avec LC3 et faciliter sa lipitation (Nemoto *et al.*, 2003) (Figure 11). De la même manière, Atg3, l'enzyme conjugatrice de LC3 sur un phospholipide, est co-immunoprécipitée avec Atg12 et sa surexpression augmente la conjugaison de Atg12 sur Atg5 (Tanida *et al.*, 2002). De plus, il a été décrit que dans des souris déficientes en Atg3, la conjugaison d'Atg12 sur Atg5 est très réduite et la dissociation du complexe Atg16L des phagophores est très retardée. Les autophagosomes formés dans ces souris sont de petite taille, ne sont pas totalement fermés et présentent une morphologie différente de ceux observés chez les souris contrôles (Sou *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les deux systèmes de conjugaison sont essentiels à la formation de l'autophagosome, de l'élongation jusqu'à la fermeture. Une autre étude a confirmé cette hypothèse en montrant que la surexpression de protéines ATG4 mutées inhibe la conjugaison de LC3 à des phospholipides et induit la production d'un nombre important d'autophagosomes non clos dans ces cellules (Fujita *et al.*, 2008a).

Par ailleurs, il a été démontré que les protéines GABARAP et GABARAPL2 sont également clivées dès leur synthèse par la cystéine protéase Atg4B afin d'exposer le résidu glycine 116 en C-terminal et donner les formes matures, GABARAP-I et GABARAPL2-I. Les protéines peuvent ensuite être conjuguées à un phospholipide, PE ou PS, grâce aux enzymes Atg7 et Atg3, comme cela a été décrit pour LC3, pour donner les formes modifiées, GABARAP-II et GABARAPL2-II (Sou, 2005; Tanida *et al.*, 2004c). Il a également été démontré que GABARAPL2 est clivée par Atg4A (Scherz-Shouval, 2002). Comme pour LC3, les protéines GABARAP-II et GABARAPL2-II se lient aux membranes internes et externes de l'autophagosome (Kabeya *et al.*, 2004). Les protéines liées sur la face externe des

autophagosomes seront recyclées alors que celles liées sur la face interne seront dégradées par les enzymes lysosomales.

Récemment, une étude a démontré que, malgré un mécanisme similaire de conjugaison, ces trois protéines n'interviennent pas au cours des mêmes étapes de la formation des autophagosomes. En effet, il a été montré, grâce à l'utilisation de siRNA spécifiques dirigés contre les différents ARNm, que les protéines de la sous-famille LC3 interviennent lors des stades précoces de la formation et de l'élongation des vésicules alors que les protéines de la sous-famille GABARAP interviennent lors des stades tardifs et plus particulièrement sont nécessaires pour la fermeture de ces structures. Cependant, même si LC3 intervient lors des stades précoces, elle reste associée à la membrane des autophagosomes jusqu'au stade final de l'élongation, ce qui explique que l'on peut la retrouver sur la membrane des autophagolysosomes et qu'elle est dégradée dans les lysosomes (Weidberg *et al.*, 2010). Mais, au cours de cette étude, les auteurs n'ont pu déterminer le rôle relatif des différents membres de la sous-famille GABARAP puisqu'ils ont ciblé tous les ARNm de la sous-famille en même temps. Cette étude devra donc être poursuivie pour déterminer quelle est la fonction de chaque protéine de cette sous-famille au cours de l'élongation de la membrane des autophagosomes.

Les protéines Rab32 et Rab33B ont également été décrites récemment comme participant à l'élongation des phagophores. Par exemple, il a été montré que Rab33B module l'élongation des phagophores *via* son interaction avec Atg16L (Hirota & Tanaka, 2009; Itoh *et al.*, 2008).

3.5)-La protéine Atg9 et ses protéines associées

La protéine Atg9 est, contrairement à la plupart des protéines Atg, une protéine transmembranaire qui est localisée à la fois au niveau du site d'assemblage des phagophores (PAS) et au niveau de sites périphériques (Noda *et al.*, 2000). La protéine Atg9 transite entre ces deux localisations et permet le transport des lipides vers le site d'assemblage des phagophores (PAS).

Chez les mammifères, deux homologues d'Atg9 de levure ont été identifiés, Atg9L1/mAtg9 et Atg9L2. La protéine mAtg9 interagit avec l'homologue d'Atg18, la protéine WIPI-1. La protéine mAtg9 est localisée, en conditions riches en nutriments, dans le réseau trans-golgien et dans les endosomes tardifs. Lors de l'induction de l'autophagie, la protéine mAtg9 transite du réseau trans-golgien vers le site d'initiation des phagophores de manière dépendante du complexe ULK1 et de l'activité kinasique hVps34 (Young *et al.*,

2006). Le mécanisme moléculaire qui gouverne le transport de la protéine mAtg9 chez les mammifères est encore non identifié. Des données récentes supposent que le transport d'Atg9 implique le complexe UVRAG-Bif-1 étant donné que Bif-1 est associée de manière transitoire à mAtg9 (Orsi *et al.*, 2010).

3.6)-Etapes de maturation et de dégradation

Les mécanismes moléculaires de la fusion des autophagosomes avec les endosomes et les lysosomes ainsi que la lyse de la membrane interne puis l'export des produits de clivage vers le cytoplasme ont été peu étudiés jusqu'à aujourd'hui.

Chez les mammifères, la maturation des autophagosomes se fait en plusieurs étapes. Ils fusionnent d'abord avec les endosomes puis avec les lysosomes. Le pH est un critère important pour la maturation des autophagosomes. En effet, les autophagosomes ont le même pH que celui du cytoplasme mais pendant la maturation, leur pH devient plus acide. Il a été suggéré que l'acidification des autophagosomes commence avant l'acquisition des enzymes lysosomales, probablement par la fusion avec des vésicules contenant des protéines membranaires lysosomales et des pompes à protons (Eskelinen, 2005). La bafilomycine A1, un inhibiteur spécifique des pompes à protons lysosomales, inhibe la fusion des autophagosomes avec les endosomes et les lysosomes, suggérant que l'acidification des autophagosomes, endosomes et lysosomes est nécessaire à la fusion (Mousavi *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 1998). La fusion est également dépendante des microtubules étant donné que la dépolymérisation des microtubules induite par le nocodazole inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Webb *et al.*, 2004).

La maturation des autophagosomes implique plusieurs protéines telles que SNARE (Atlashkin *et al.*, 2003), Rab7 (Gutierrez *et al.*, 2004; Jager *et al.*, 2004), ESCRT et le complexe Vps de classe C (Rusten *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été décrit que la protéine UVRAG est impliquée dans la maturation des autophagosomes. UVRAG recrute et interagit avec la protéine Vps de classe C et, *via* cette interaction, active Rab7 (Liang *et al.*, 2008). Récemment, une autre protéine interagissant avec Beclin1, la protéine Rubicon a été décrite pour inhiber la maturation des autophagosomes (Matsunaga *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2009). La dégradation du contenu de l'autophagosome est la dernière étape du processus. Les enzymes lysosomales, incluant les cathepsines, les lipases et les glycoprotéases, dégradent les macromolécules présentes dans les vésicules autophagiques puis les produits obtenus sont exportés vers le cytoplasme par un mécanisme encore inconnu. Chez les mammifères, aucun homologue des protéines de levure Atg15 (lipase) et Atg22 (protéines d'efflux) n'a encore été

identifié mais des homologues d'Avt3 et Avt4, des protéines vacuolaires qui jouent un rôle dans l'efflux des acides aminés vers le cytoplasme (Russnak *et al.*, 2001), ont été identifiés : SLC36A1/LYAAT1 (*Lysosomal amino acid transporter 1*) et SLC36A4/LYAAT2, respectivement (Sagne *et al.*, 2001).

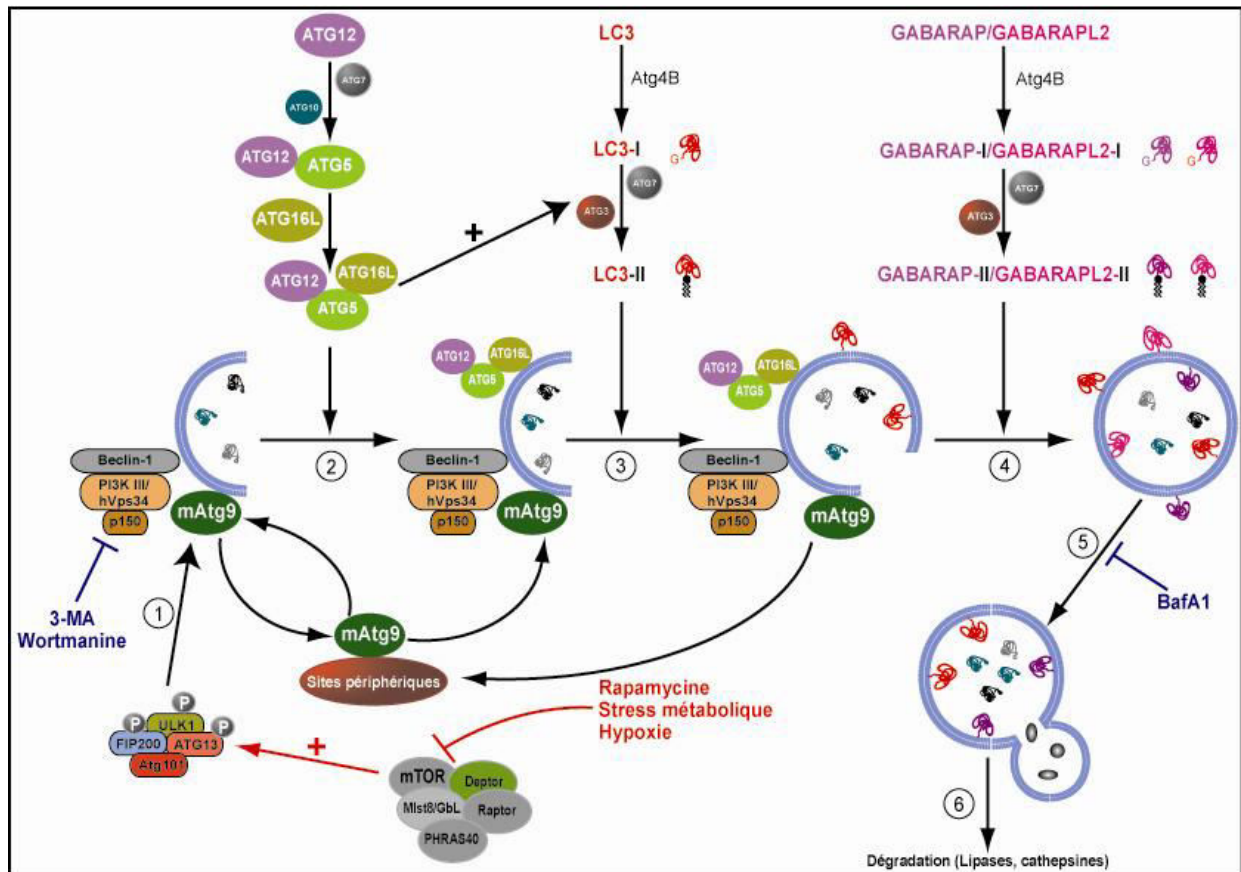


Figure 12 : Modèle général détaillé du mécanisme de l'autophagie. Le complexe PI3 kinase de classe III et la protéine mAtg9 sont recrutés précocement au niveau du site d'assemblage des phagophores (PAS). **1** : Induction de l'autophagie caractérisée par l'activation du complexe ULK1. Le complexe ULK1 permet la redistribution de mAtg9 qui transite entre les sites périphériques et le site d'assemblage des phagophores et fournit des lipides lors de la formation des autophagosomes. **2** : La nucléation des phagophores est marquée par la production du PI3P par le complexe PI3 kinase de classe III ainsi que la formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16. **3** : La protéine LC3-II est recrutée par le complexe Atg12-Atg5-Atg16L et participe à l'élongation des phagophores. **4** : Les protéines GABARAP-II et GABARAPL2-II participent à la fermeture des autophagosomes. Une fois les autophagosomes formés, le complexe PI3 kinase de classe III, la protéine mAtg9 ainsi que le complexe Atg12-Atg5-Atg16L se détachent de la membrane externe des autophagosomes. Seules les protéines LC3-II, GABARAP-II et GABARAPL2-II restent associées aux membranes des autophagosomes. **5** : Les autophagosomes fusionnent avec les endosomes puis les lysosomes. **6** : Le contenu vésiculaire ainsi que les protéines LC3-II, GABARAP-II et GABARAPL2-II localisées au niveau de la membrane interne des autophagosomes sont dégradées par les enzymes du lysosome. Les composés inhibiteurs de l'autophagie sont représentés en bleu et les inducteurs en rouge.

4)-Rôles de l'autophagie

4.1)-Généralités

L'autophagie, survenant à un niveau basal dans les cellules, assure le maintien de l'homéostasie cellulaire *via* la dégradation des protéines à longue durée de vie et les organites endommagés (Marino *et al.*, 2010b). En effet, il a été observé que les souris déficientes pour Atg5, une protéine nécessaire pour l'autophagie, meurent seulement un jour après leur naissance. De plus, ces souris présentent un taux tissulaire d'acides aminés diminué ainsi qu'un niveau énergétique très faible. Ces résultats démontrent que les produits de dégradation obtenus par autophagie sont nécessaires au maintien de l'homéostasie ainsi qu'à la survie des cellules (Kuma *et al.*, 2004) (Figure 13).

L'autophagie joue un rôle dans le développement et la différenciation cellulaire. En effet, il a été démontré que des souris Atg4B^{-/-}, une enzyme nécessaire à la maturation des protéines de la famille Atg8, présentent plusieurs anomalies du développement et du fonctionnement de l'oreille interne. Chez les souris déficientes en autophagie, la sécrétion et l'assemblage des protéines impliquées dans la formation de structures importantes à la biogenèse de l'oreille interne sont inhibées (Marino *et al.*, 2010a).

De plus, l'autophagie est impliquée dans plusieurs pathologies dont les maladies neurodégénératives (Marino *et al.*, 2010b; Mizushima *et al.*, 2008). L'étude des souris *knockout* Atg7 et Atg5 a montré une accumulation d'agrégats de protéines ubiquitinylées dans les cellules neuronales ainsi que l'apparition de plusieurs désordres neurodégénératifs tels que les déficits moteurs, l'ataxie et le retard de la croissance axonale (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Nishiyama *et al.*, 2007). Récemment, il a été démontré que l'inhibition de l'expression de FIP200, une protéine du complexe PI3 kinase de classe III, conduit à une dégénérescence cérébrale accompagnée par une augmentation de la mort cellulaire par apoptose (Liang *et al.*, 2010). Ces résultats démontrent clairement que l'autophagie joue un rôle important dans la dégradation constitutive des protéines cytosoliques dans le système nerveux central et protège donc de la neurodégénérescence.

L'autophagie est également impliquée dans le cancer. En effet, une relation inverse existe entre l'autophagie et la transformation maligne. Cependant, l'autophagie est également bénéfique pour les cellules cancéreuses afin de survivre au stress et donc se multiplier. Ainsi l'autophagie à un rôle paradoxal : elle protège contre la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse mais au cours des stades plus avancées de la tumorigenèse, elle contribue à la survie des cellules cancéreuses (voir paragraphe 4.3) (Chen & Debnath, 2010).

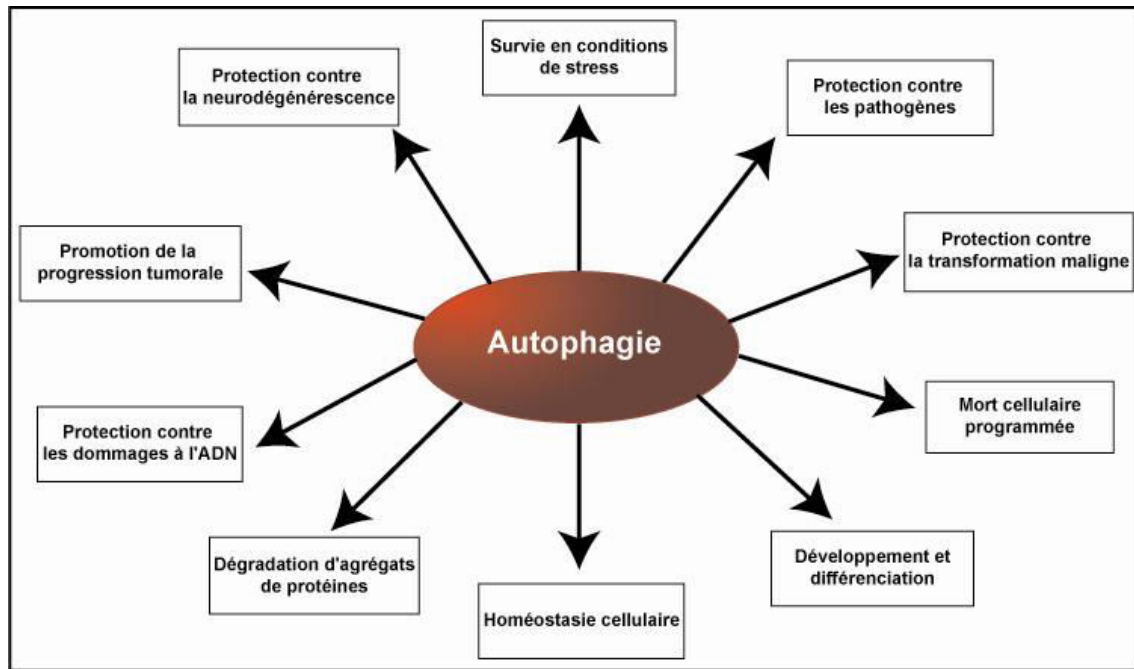


Figure 13 : Différents rôles de l'autophagie.

L'autophagie joue également un rôle important dans l'immunité innée et adaptative. Elle protège les cellules contre les pathogènes intracellulaires libres ou internalisés dans des vacuoles (bactéries et virus) en participant à leur élimination et participe à la présentation d'antigènes issus de la dégradation par autophagie *via* les complexes majeurs d'histocompatibilité (Levine & Deretic, 2007; Munz, 2009). Ainsi, l'autophagie est considérée comme un mécanisme de défense cellulaire contre les infections virales et bactériennes. Cependant, les pathogènes peuvent aussi détourner la machinerie autophagique afin de proliférer dans ces compartiments internes empêchant ainsi leur dégradation par les enzymes cellulaires (Joubert *et al.*, 2011).

4.2)-Autophagie et apoptose

L'autophagie a été décrite initialement comme un mécanisme qui permet aux cellules de survivre en conditions défavorables. Cependant, des études ont montré que ce mécanisme pouvait dans certains cas conduire à une mort cellulaire programmée différente de l'apoptose (mort cellulaire programmée de type I) appelée mort autophagique ou mort cellulaire programmée de type II (Clarke, 1990). Contrairement à l'apoptose, la mort par autophagie est caractérisée par la présence excessive de vacuoles autophagiques, est indépendante de l'activation des caspases et n'implique pas de fragmentation de l'ADN (Kirisako *et al.*, 1999). Au cours de la mort par autophagie, un gonflement des organites ainsi qu'une préservation du cytosquelette sont observés (Bursch *et al.*, 2000) et, comme pour l'apoptose, la mort autophagique n'induit aucune inflammation (Schweichel & Merker, 1973). Ce type de mort cellulaire a été principalement décrit lors de processus tels que le maintien de l'homéostasie et le remodelage tissulaire pendant le développement au cours duquel plusieurs cellules sont redondantes et nécessitent d'être éliminées (Levine & Klionsky, 2004; Levine & Yuan, 2005). D'autres études ont montré que la mort par autophagie est déclenchée suite à un excès de dégradation des composés cellulaires. En effet, dans des cellules dans lesquelles la protéine Beclin1 est mutée et donc incapable de lier Bcl-2, un taux d'autophagie très élevé a été observé, suivi de la mort cellulaire. Cette mort cellulaire observée dans ces cellules est inhibée par l'extinction du gène *atg5* (Patingre *et al.*, 2005). La mort par autophagie a également été observée suite à un stress cytotoxique dans des cellules dans lesquelles l'apoptose est inhibée. En effet, dans des cellules exposées à des inhibiteurs de l'apoptose ou dans lesquels les gènes pro-apoptotiques comme Bax (*Bcl-2-Associated X protein*) et Bad (*Bcl-2-associated Agonist of cell Death*) sont éteints ainsi que dans des cellules surexprimant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-XL (*B Cell Lymphoma-extra Large*), la mort par autophagie a été observée. Au cours de ces études, l'inhibition de l'expression de certains gènes de l'autophagie, tels que *atg5*, *atg7* ou *beclin1* inhibe la mort de ces cellules témoignant ainsi que la mort cellulaire induite dans ces cellules est directement liée à l'autophagie (Moretti *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Ces différents exemples montrent que la mort par autophagie a lieu principalement dans des cellules déficientes pour l'apoptose et non dans des situations physiologiques normales.

La relation entre ces deux processus étroitement liés a été initialement mise en évidence grâce à l'existence d'acteurs moléculaires communs entre ces deux processus tels que Bcl-2, Bcl-XL, Beclin1 et Atg5 (Zhou *et al.*, 2011). En effet, Beclin1 a été initialement

découverte par la technique du double hybride comme un partenaire de la protéine Bcl-2 (Liang *et al.*, 1998). Beclin1 possède un domaine BH3 grâce auquel elle peut se lier à la protéine Bcl-2 et à ses homologues tels que Bcl-XL et Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia sequence 1*) (Maiuri *et al.*, 2007a). L'interaction de Beclin1 avec Bcl-2/Bcl-XL induit la perturbation de la liaison de Beclin1 avec la kinase Vps34 et l'inhibition de l'autophagie. Ces résultats suggèrent que les protéines Bcl-2/Bcl-XL inhibent l'autophagie par la séquestration de Beclin1 (Figure 14). Dans cette étude, il a été également montré que seule la protéine Bcl-2 localisée au niveau du réticulum endoplasmique, et non celle localisée au niveau de la mitochondrie, est responsable de l'inhibition de l'autophagie (Patingre *et al.*, 2005). De plus, la mutation du domaine BH3 de Beclin1 et du domaine récepteur de Bcl-2 permet la suppression complète de l'inhibition de l'autophagie dépendante de Beclin1 (Maiuri *et al.*, 2007b). D'autre part, Bcl-2 est un régulateur de la voie de signalisation PI3K-Akt et pourrait être un effecteur agissant en amont et activer la protéine mTOR conduisant ainsi à l'inhibition de l'autophagie (Aziz *et al.*, 2006; Fresno Vara *et al.*, 2004).

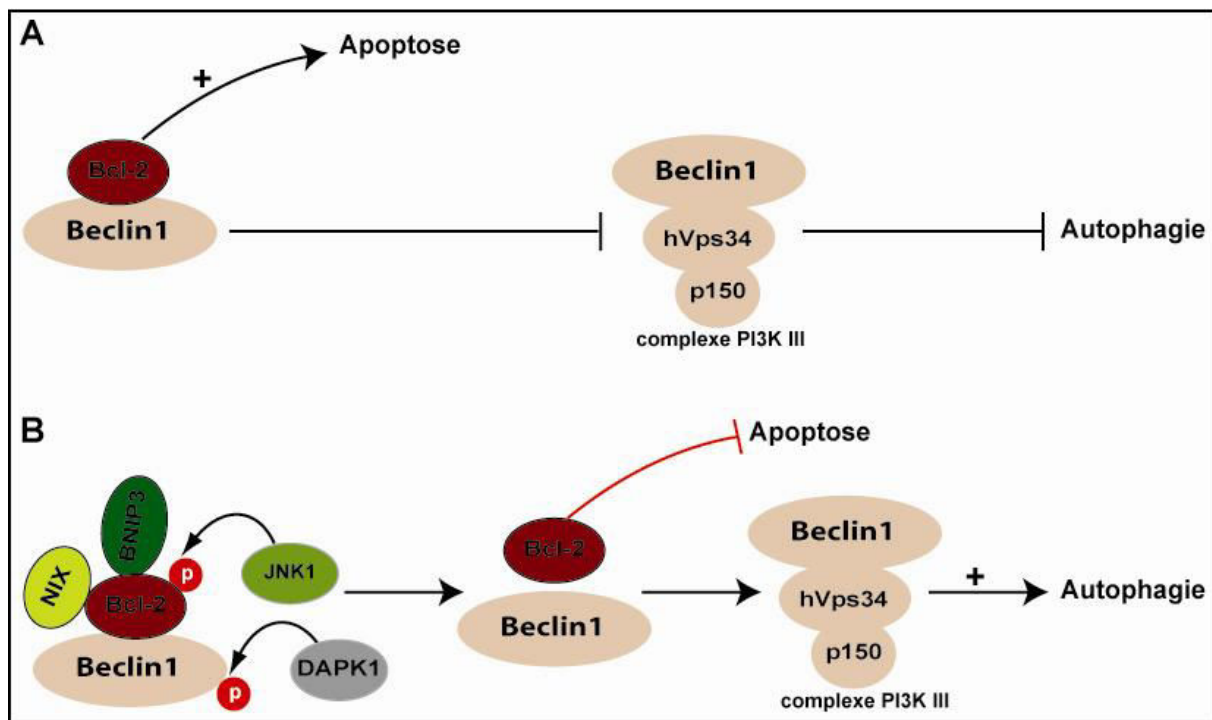


Figure 14 : Rôle de la protéine Bcl-2 dans l'autophagie. A) Beclin1 interagit avec Bcl-2 *via* son domaine BH3, ce qui empêche sa liaison avec hVps34 et inhibe ainsi l'initiation de l'autophagie. B) La phosphorylation de Bcl-2 par JNK1, ainsi que sa liaison avec BNIP3 et NIX inhibent la formation du complexe Bcl-2-Beclin1. La phosphorylation de Beclin1 par DAPK1 inhibe également la formation du complexe protéique Bcl-2-Beclin1. Suite à la dissociation du complexe, Bcl-2 peut alors exercer son rôle anti-apoptotique alors que Beclin1 peut participer à la formation du complexe PI3Kinase de classe III.

D'autres effecteurs de l'apoptose interagissent avec Beclin1 tels que Bcl-Xl et Mcl-1 et cette interaction inhibe également l'induction de l'autophagie (Erlich *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007a). Le statut de phosphorylation de ces protéines est important pour leur rôle d'inhibiteurs ou d'activateurs de l'autophagie ou de l'apoptose. En conditions de carence nutritionnelle, la kinase JNK1 phosphoryle Bcl-2, ce qui induit une dissociation du complexe Beclin1-Bcl-2 et l'activation de l'autophagie (Wei *et al.*, 2008). La formation du complexe Beclin1-Bcl-2 est également inhibée suite à l'expression de BNIP3 (*Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein*), une protéine de la famille Bcl-2 possédant également un domaine BH3, ce qui conduit à l'induction de la mitophagie (Zhang & Ney, 2009). Par ailleurs, Beclin1 peut être phosphorylée au niveau de son domaine BH3 par la protéine suppresseur de tumeur DAPK1 (*Death-associated protein kinase 1*), ce qui conduit à la dissociation du complexe Beclin1-Bcl-XL et donc à l'induction de l'autophagie (Zalckvar *et al.*, 2009) (Figure 14). La formation de ce complexe est également perturbée par la liaison de Bcl-XL avec ARF, une protéine suppresseur de tumeur et régulateur du cycle cellulaire, ce qui conduit à la libération de Beclin1 et à l'induction de l'autophagie (Pimkin *et al.*, 2009).

Très récemment, il a été démontré que Beclin1 est clivée par la caspase-3 inhibant ainsi son activité pro-autophagique. De plus, le produit du clivage de Beclin1 acquiert une nouvelle fonction et active l'apoptose en augmentant la libération de facteurs pro-apoptotiques à partir des mitochondries (Wirawan *et al.*, 2010). La caspase-3 active est également responsable du clivage de la protéine Atg4D. La protéine Atg4D clivée est alors adressée à la mitochondrie où elle active la libération du cytochrome c et l'apoptose (Betin & Lane, 2009).

Yousefi et collaborateurs ont, quant à eux, montré pour la première fois l'implication de la protéine Atg5 au cours de l'apoptose, ce qui en fait un nouvel acteur moléculaire à l'interface entre l'apoptose et l'autophagie. En effet, ces auteurs ont démontré que Atg5 est clivée par les calpaïnes 1 et 2 et que la forme tronquée de Atg5 est transportée du cytosol vers la mitochondrie où elle induit la libération du cytochrome c et l'activation des caspases (Yousefi *et al.*, 2006). La forme tronquée d'Atg5 se lie également à Bcl-XL et induit la dissociation du complexe Bcl-XL-Bax, ce qui conduit à la formation du complexe Bax-Bax et à l'induction de l'apoptose. L'apoptose induite par la forme tronquée de Atg5 peut être observée en l'absence d'autophagie (Yousefi *et al.*, 2006). Très récemment, l'équipe de Xia et collaborateurs, a montré que le clivage d'Atg5 par les calpaïnes inhibe son rôle d'activateur de l'autophagie (Xia *et al.*, 2010).

a)-Rôle de p53 au cours de l'autophagie

La protéine p53 est une anti-oncoprotéine qualifiée de gardien du génome qui joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose *via* la transactivation de nombreux gènes tels que pRb et p21 (Levine & Oren, 2009). Par ailleurs, la protéine p53 a également été décrite pour être impliquée dans le processus de l'autophagie au sein duquel elle joue un rôle paradoxal selon sa localisation sub-cellulaire. Dans le noyau, la protéine p53 régule positivement l'autophagie par activation de la transcription de plusieurs gènes codant des protéines pro-autophagiques telles que les protéines DRAM (*Damage-regulated autophagy modulator*) (Crighton *et al.*, 2006), sestrin1 et 2 (Budanov & Karin, 2008), TSC2, AMPK, DAPK-1, PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) (Feng *et al.*, 2007) et les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bad, Bax, BNIP3 et PUMA (*P53-Up-regulated Modulator of Apoptosis*) (Morselli *et al.*, 2009). L'ensemble de ces gènes, régulés par p53, intervient au cours de nombreuses voies de signalisation dont celle conduisant à l'inhibition de mTOR et donc à l'activation de l'autophagie en réponse à des conditions de stress génotoxique (Feng *et al.*, 2005). Par ailleurs, très peu de gènes régulant négativement l'autophagie ont été décrits comme étant régulés par la protéine p53. Contrairement à la protéine p53 nucléaire, la protéine p53 cytoplasmique inhibe l'autophagie (Tasdemir *et al.*, 2008a). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'inactivation de p53, par des composés chimiques ou par extinction du gène par la technique des siRNA, conduit à l'induction de l'autophagie caractérisée par la formation des autophagosomes et une dégradation massive de p62 (Tasdemir *et al.*, 2008a). Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie par p53 est maximale lorsque la séquence NLS (*Nuclear Localization Sequence*) de p53 est délétée par contre l'inhibition de l'autophagie par p53 est complètement abolie lorsque la séquence NES (*Nuclear Export Signal*) de p53 est délétée (Tasdemir *et al.*, 2008a). Il a également été montré que des inducteurs de l'autophagie tels que la rapamycine inhibent la protéine HDM2, une E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de p53 par le protéasome (Tasdemir *et al.*, 2008a). D'autre part, dans des cellules humaines de cancer de colon (HCT116) dont le gène p53 est délété, il a été observé un niveau d'autophagie très élevé qui revient à un niveau basal après surexpression de la protéine p53. (Tasdemir *et al.*, 2008b).

L'ensemble de ces données démontre que p53 joue un double rôle dans la régulation de l'autophagie. Elle active l'autophagie *via* son activité de facteur de transcription lorsqu'elle est localisée dans le noyau et inhibe l'autophagie, indépendamment de sa fonction de facteur de transcription lorsqu'elle est localisée dans le cytoplasme. Cependant, le mécanisme par

lequel la protéine p53 régule l'autophagie n'est pas complètement élucidé. Une première étude a montré que la protéine FIP200, qui est impliquée dans la formation du complexe ULK1, est la seule protéine autophagique interagissant avec la protéine p53. Ainsi, les auteurs suggèrent que la protéine p53 cytoplasmique pourrait inhiber la formation du complexe ULK1 *via* son interaction avec FIP200 (Gan & Guan, 2008). Très récemment, il a été démontré que les gènes *ulk1* et *ulk2* sont positivement régulés par la protéine p53 localisée dans le noyau et induite en réponse à des drogues génotoxiques tels que l'étoposide et la camptothécine. Il en résulte une augmentation du taux d'autophagie qui provoque une mort cellulaire non-apoptotique (Gao *et al.*, 2011). Ces données pourraient fournir un autre mécanisme de régulation de l'autophagie par la protéine p53 *via* deux voies distinctes passant soit par le noyau, soit par le cytoplasme.

b)-Rôle de HMGB1 au cours de l'autophagie

La protéine HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) est une protéine nucléaire qui influence la transcription ainsi que d'autres fonctions nucléaires. La libération de la protéine HMGB1 constitue une caractéristique majeure des cellules qui entrent dans un processus de mort cellulaire. Il a longtemps été admis que HMGB1 est passivement libérée par les cellules qui meurent par nécrose mais pourrait également être libérée au cours des stades tardifs de l'apoptose, après formation des corps apoptotiques (Scaffidi *et al.*, 2002). Par ailleurs, HMGB1 est activement sécrétée par les cellules du système inflammatoire telles que les macrophages, les cellules NK (*Natural Killer*) et les cellules dendritiques (Wang *et al.*, 1999b). Une fois libérée, HMGB1 constitue un médiateur très important de la réponse immunitaire. En effet, dans l'espace extracellulaire, HMGB1 se lie à plusieurs récepteurs tels que les récepteurs TLR2 et 4 (*Toll-Like Receptor*) et RAGE (*Receptor for Advanced Glycosylation End product*) et contrôle l'initiation de la réponse immunitaire (Park *et al.*, 2006; Rovere-Querini *et al.*, 2004). Après sa libération, HMGB1 interagit avec le TLR4 présent à la surface des cellules dendritiques et participe à la maturation et la présentation des antigènes tumoraux (Apetoh *et al.*, 2007).

D'autre part, il a été démontré que TLR4 et HMGB1 sont impliqués dans l'autophagie. En effet, le TLR4 a été décrit comme un inhibiteur de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Shiratsuchi *et al.*, 2004). Il a été également démontré que la libération de HMGB1 est contrôlée par l'autophagie et que HMGB1 régule positivement l'autophagie (Tang *et al.*, 2010). L'induction de l'autophagie dans des lignées humaines et de souris par la rapamycine ou l'EBSS induit la translocation de HMGB1 du noyau vers le cytosol de manière dépendante

des ROS, translocation qui est inhibée par des inhibiteurs de l'autophagie ou par extinction du gène *Atg5* (Tang *et al.*, 2010). Dans la même étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de la libération de HMGB1 inhibe l'autophagie, suggérant ainsi un rôle positif de HMGB1 dans la régulation de l'autophagie. L'étude du mécanisme moléculaire par lequel HMGB1 régule l'autophagie a montré que HMGB1 interagit avec la protéine Beclin1 en conditions de stress, perturbant ainsi l'interaction de Beclin1 avec Bcl-2 et donc conduisant à l'activation de l'autophagie (Tang *et al.*, 2010). Une autre étude a décrit la libération sélective de HMGB1 par l'autophagie suite au traitement par des drogues chimiothérapeutiques. En effet, dans des cellules de glioblastomes traités par la toxine diphtérique fusionnée à l'EGF, l'autophagie est accrue et induit la libération sélective de HMGB1 (Thorburn *et al.*, 2009). Dans ces cellules, aucun signe de nécrose n'est observé et la libération de HMGB1 est abolie quand l'autophagie est inhibée. L'ensemble de ces résultats montre que l'autophagie est nécessaire et suffisante pour la libération de HMGB1 par les cellules tumorales avant leur mort (Thorburn *et al.*, 2009). Ainsi il est supposé que la libération spécifique de HMGB1 induit l'activation dépendante du TLR4 des cellules dendritiques, impliquant une réponse immunitaire spécifique. Moduler l'autophagie s'avère donc une approche prometteuse pour le traitement des cellules tumorales en exploitant la réponse immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales ayant échappé à la chimiothérapie.

4.3)-Autophagie et cancer

Le rôle de l'autophagie dans la progression tumorale est paradoxal et varie selon le type de tumeurs mais surtout selon le stade d'avancement de la tumeur (Chen & Debnath, 2010) (Figure 15) :

1) l'autophagie présente un rôle protecteur contre l'apparition des tumeurs car elle prévient la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse en dégradant les protéines et organites endommagés et en prévenant de nombreux stress génotoxiques (Levine, 2007) ;

2) plusieurs études ont démontré le rôle négatif de l'autophagie lors des étapes ultérieures de la progression tumorale. En effet, avant l'angiogenèse de la tumeur, l'autophagie permet la survie des cellules cancéreuses en réponse à un stress métabolique et particulièrement en absence de nutriments et d'oxygène (Degenhardt *et al.*, 2006) ;

3) l'autophagie peut induire la mort cellulaire et ceci particulièrement lorsque l'apoptose est inhibée et donc ralentir la prolifération des cellules cancéreuses ;

4) l'autophagie peut faciliter le développement d'une résistance aux composés chimiothérapeutiques utilisés lors du traitement des tumeurs (Chen *et al.*, 2010).

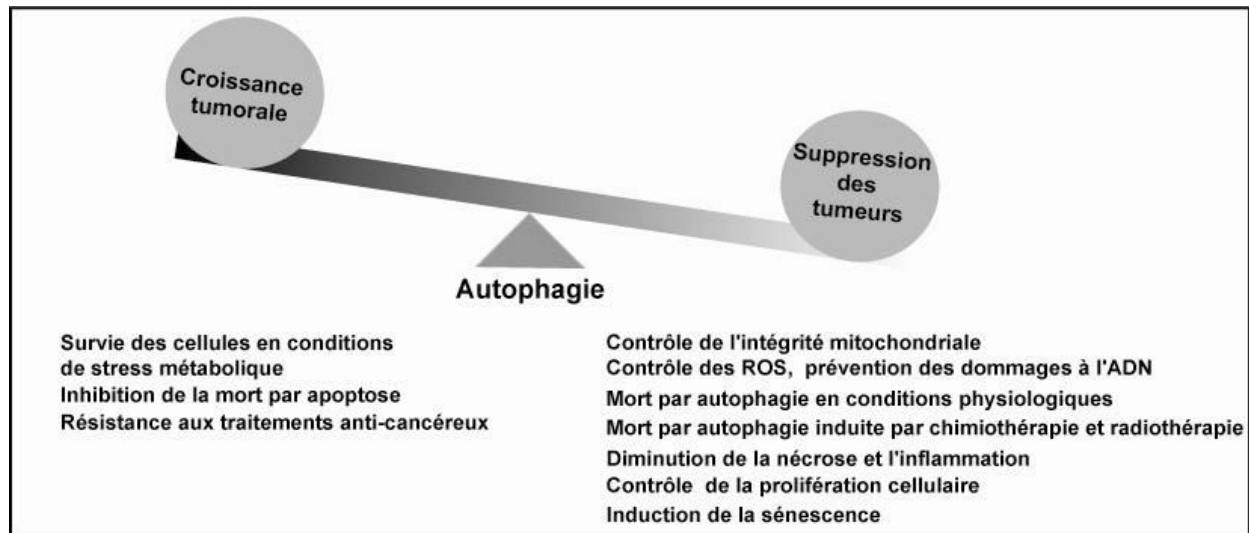


Figure 15 : Effets paradoxaux de l'autophagie lors de la tumorigenèse et la croissance tumorale.
Modifié d'après Levine 2007.

a)-Autophagie et oncogenèse

Il est maintenant admis que le taux d'autophagie basal est diminué dans les cellules tumorales et que l'expression de plusieurs effecteurs de l'autophagie est fortement diminuée (Roy & Debnath, 2010). Ces données ont permis de classer plusieurs gènes *atg* parmi la classe des gènes suppresseurs de tumeurs. La première protéine qui a été décrite comme suppresseur de tumeurs est la protéine Beclin1 (Atg6) (Aita *et al.*, 1999). En 1999, Liang et collaborateurs ont rapporté que *Beclin1* est un potentiel gène suppresseur de tumeurs dont l'haplo-insuffisance est observée dans des cancers sporadiques humains du sein et de l'ovaire. La réintroduction de ce gène dans des cellules MCF-7 en culture restaure le taux d'autophagie, diminue leur croissance en agar mou et inhibe la formation de tumeurs dans des souris *nude* (Liang *et al.*, 1999). De plus, l'haplo-insuffisance du gène *beclin1* conduit à l'apparition de tumeurs spontanées dans plusieurs organes chez la souris (Qu *et al.*, 2003). De plus, il a été décrit que Beclin1 peut inhiber la prolifération des cellules de cancer du sein *via* son interaction avec le récepteur aux estrogènes et bloque ainsi l'effet des estrogènes décrits pour leur effet mitogène dans les cancers du sein estrogéno-dépendants (John *et al.*, 2008).

Cependant, le rôle de l'autophagie comme mécanisme suppresseur de tumeur ne se limite pas uniquement aux données acquises pour *beclin1*. En effet, l'expression d'autres gènes de l'autophagie est également altérée dans différents types de tumeurs. Les souris *atg4C^{-/-}* présentent un risque plus élevé de développer des fibrosarcomes induits par des carcinogènes chimiques. Notons que le gène *atg4C* appartient à la famille des Atg4 responsables du clivage des protéines Atg8 et de ses homologues (Marino *et al.*, 2007). La délétion du gène *atg5* a été observée dans des tumeurs malignes du système immunitaire (cellules NK). Par ailleurs, il a été rapporté que les gènes *atg12*, *atg9* et *atg5* présentent des mutations dans des carcinomes gastriques et colorectaux (Kang *et al.*, 2009).

Les gènes *lc3* et *Atg7* sont localisés sur les locus 16q24.1 et 3p25.2, des locus fréquemment délétés dans les cancers du foie, du sein, de la prostate et de l'ovaire (16q24.1) et dans les cancers du poumon (3p25.2), respectivement (Jin, 2006). D'autres gènes impliqués dans l'autophagie sont également liés au développement des cancers. Par exemple la mutation du gène UVRAG, une protéine qui se lie à Beclin1 au sein du complexe PI3K de classe III, induit une diminution de l'autophagie et l'induction de carcinomes gastriques et colorectaux (Kim *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2006). Par ailleurs, la diminution de l'expression de Bif-1, une autre protéine impliquée dans la régulation positive de l'autophagie et de l'apoptose, est également liée au développement d'adénocarcinomes de colon (Coppola *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces données démontre que l'autophagie présente un rôle suppresseur de tumeurs mais le mécanisme moléculaire n'est pas entièrement connu. Il a été rapporté que l'inhibition de l'autophagie conduit à l'accumulation d'agrégats protéiques et d'organites endommagés qui pourraient interférer avec certaines fonctions cellulaires telles que la mitose et la réparation de l'ADN (Mathew & White, 2007). Ces agrégats de protéines toxiques et ces organites non dégradés sont une source potentielle de stress génotoxiques qui peuvent induire de nombreuses aberrations chromosomiques et des divisions anarchiques conduisant à la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale. En effet, des études ont montré que, dans les cellules cancéreuses dont les points de contrôle du cycle cellulaire sont inactivés, l'autophagie limite l'accumulation de dommages génomiques, diminue le taux de mutations responsables de ces dommages ainsi que les instabilités chromosomiques, suggérant ainsi que l'autophagie peut être considérée comme un mécanisme de défense autonome contre l'apparition des tumeurs (Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2007). D'autres résultats ont montré un rôle de la protéine p62, une protéine substrat de l'autophagie, dans la tumorigenèse. En effet, une accumulation aberrante de mitochondries endommagées ainsi que d'agrégats de protéines a été observée dans des cellules déficientes en autophagie conduisant

ainsi à l'augmentation de la production des ROS. Cela induit l'accumulation de dommages liés à l'ADN et l'accumulation de la protéine p62. De plus, en conditions de stress métaboliques, l'accumulation de p62 contribue à la génération de ROS (Mathew *et al.*, 2009). Ainsi, l'autophagie protège contre la transformation maligne des cellules *via* son rôle dans la dégradation de protéines et organites endommagés contrôlant ainsi la production de ROS.

Un autre mécanisme par lequel l'autophagie prévient l'apparition de tumeurs est l'induction de la sénescence. La sénescence représente un stade d'arrêt stable du cycle cellulaire dans lequel les cellules restent métaboliquement actives. C'est un mécanisme notamment observé pour les cellules ayant subi un stress oncogénique. Des études ont montré que la sénescence induite par les oncogènes (OIS, *Oncogene-induced senescence*) est médiée par le système inflammatoire incluant les interleukines IL-6 et IL-8 (Kuilman *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude a montré dans un système utilisant l'oncogène Ras (*RAt Sarcoma*), que l'autophagie est importante pour l'entrée en sénescence des cellules ayant subi un stress oncogénique (Young *et al.*, 2009). Dans cette étude, il a été démontré que l'autophagie est essentielle à l'OIS puisqu'une inhibition de la sécrétion des cytokines IL6 et IL8 ainsi qu'une inhibition de l'entrée en sénescence ont été observées dans des cellules *atg7^{-/-}* et *atg5^{-/-}* (Young *et al.*, 2009). En effet, l'autophagie *via* son rôle dans la dégradation cellulaire, facilite la sénescence en fournissant des acides aminés pour la synthèse des protéines sécrétées et nécessaires pour l'OIS (Narita & Young, 2009). L'autophagie basale joue donc un rôle important dans le contrôle de la croissance et la prolifération cellulaires et particulièrement lors de stress oncogéniques.

b)-Autophagie et progression tumorale

Outre son rôle positif lors de la prévention de l'apparition de tumeurs, l'autophagie peut paradoxalement permettre la survie des cellules tumorales en conditions de stress (Ogier-Denis & Codogno, 2003). Pendant la progression tumorale, les cellules cancéreuses survivent dans des conditions de stress extrêmes telles que l'hypoxie et la carence nutritionnelle avant la vascularisation de la tumeur par angiogenèse. Dans ces conditions, on observe une adaptation du métabolisme des cellules cancéreuses à cet environnement anaérobique et une augmentation de leurs capacités autophagiques (Hockel & Vaupel, 2001; Shankar *et al.*, 1996). La capacité des cellules tumorales à tolérer ces stress métaboliques diffère d'un type cellulaire à un autre. Par exemple, certaines cellules de cancer du colon survivent aux stress métaboliques pendant de longues périodes et sont caractérisées par un très fort taux

d'autophagie, alors que les cellules de cancer du foie sont sensibles aux stress métaboliques (Izuishi *et al.*, 2000).

Degenhard et collaborateurs ont été les premiers à montrer que l'autophagie est induite dans les tumeurs solides en hypoxie (Degenhardt *et al.*, 2006). D'autres équipes ont montré que la survie des cellules en hypoxie est liée au facteur HIF1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*), un facteur de transcription régulant plusieurs processus et un régulateur positif de l'autophagie. Par ailleurs, il a été démontré que la protéine BNIP3 est régulée par le facteur HIF1 α . BNIP3 est une protéine pro-apoptotique et également décrite pour son rôle dans l'induction de la mitophagie, un mécanisme par lequel elle contrôle la production des ROS en hypoxie (Zhang *et al.*, 2008). Il a été rapporté que l'induction de BNIP3 et BNIP3L dans des cellules en hypoxie, conduit à la dissociation du complexe Beclin1-Bcl-2, la libération de Beclin1 et par conséquent l'activation de l'autophagie (Bellot *et al.*, 2009; Tracy *et al.*, 2007). D'autres données ont démontré que la réponse au stress tels que l'UPR (*Unfolded Protein Response*) et la voie de signalisation de l'AMPK induisent l'autophagie dans des cellules cancéreuses en hypoxie (Papandreou *et al.*, 2008; Rouschop *et al.*, 2010). L'ensemble de ces travaux témoigne du rôle négatif de l'autophagie pendant la progression tumorale.

D'autres mécanismes ont été rapportés et démontrent que l'autophagie diminue la progression tumorale en induisant la mort par autophagie ou l'induction de l'apoptose après traitement par des drogues anti-cancéreuses. Par exemple, la mort par autophagie a été observée *in vitro* et *in vivo* dans des gliomes humains suite à un traitement par le THC (Δ^9 -Tétrahydrocannabinol) qui induit un stress du réticulum endoplasmique. Dans ces cellules, les deux processus de mort cellulaire, l'apoptose et l'autophagie, sont actifs puisque l'inhibition d'un seul des deux processus inhibent seulement partiellement la mort cellulaire (Salazar *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que des cellules de cancer de pancréas humaines meurent par autophagie et apoptose suite à un traitement par la gemcibatine. L'inhibition de l'autophagie par la 3-Méthyladénine qui inhibe la formation du complexe PI3 kinase de classe III, inhibe également la capacité de la gemcibatine à induire l'apoptose. Ce résultat suggère que l'autophagie participe à la mort des cellules cancéreuses *via* l'apoptose (Pardo *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été montré que l'autophagie induit la mort cellulaire des cellules MCF-7 en réponse au traitement par le 4OH-Tamoxifène permettant ainsi la diminution de la progression tumorale (Bursch *et al.*, 1996).

c)-Autophagie et valeur pronostique

L'expression de certains gènes de l'autophagie a été corrélée à un facteur de bon pronostic dans plusieurs types de cancers. L'expression de la protéine Beclin1 a été étudiée chez des patients atteints de cancer de l'œsophage. Beclin1 est faiblement exprimée dans les stades tardifs des cancers et son expression a été corrélée à un meilleur taux de survie de ces patients (Chen *et al.*, 2009). De fortes expressions de la protéine Beclin1 cytoplasmique ont été corrélées à la survenue de l'apoptose dans des gliomes de haut grade mais une relation inverse entre l'expression de Beclin1 et la prolifération cellulaire a été observée dans ces gliomes. Ainsi la forte expression de Beclin1 a été associée à une meilleur survie des patients atteints de gliomes (Pirtoli *et al.*, 2009).

L'expression de LC3 est également associée à une augmentation des taux de survie de patients présentant des gliomes (Aoki *et al.*, 2008). En revanche, son expression est associée à un faible taux de survie de patients avec un cancer du pancréas (Fujii *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'expression de LC3 est régulée positivement dans plusieurs cancers gastrointestinaux mais aucune corrélation entre l'expression de LC3 et la survie des patients n'a pu être mise en évidence (Yoshioka *et al.*, 2008). Il a également été rapporté que l'expression des protéines Beclin1 et LC3 est altérée dans des lésions associées aux mélanomes. En effet, Beclin1 est faiblement exprimée dans des lésions malignes et LC3 est significativement sous-exprimée dans des métastases de mélanomes (Miracco *et al.*, 2010).

L'expression de GABARAP, une protéine impliquée dans la formation des autophagosomes, est également associée à la survie de patients avec certains types de cancers. GABARAP est faiblement exprimée dans des cellules de cancer du sein et sa surexpression dans ces cellules inhibent leur prolifération cellulaire (Klebig *et al.*, 2005). En revanche, GABARAP est fortement exprimée dans des adénomes et des cancers de la thyroïde (Roberts *et al.*, 2009). D'autre part, l'expression de GABARAP est associée à une meilleur survie de patients atteints de neuroblastomes alors qu'elle est corrélée à un faible taux de survie de patients développant des carcinomes colorectaux (Miao *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données suggère ainsi que l'impact clinique et la signification biologique des variations d'expression de certaines protéines de l'autophagie dans les cellules et tissus cancéreux semblent être spécifiques de chaque type de cancer et du contexte tissulaire.

4.4)-Autophagie et résistance aux drogues anti-cancéreuses

L'apparition d'une résistance aux drogues anti-cancéreuses a été observée dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein, de l'œsophage ou le cancer colorectal. Dans la plupart des cas, les thérapies utilisées à ce jour (radiothérapie et chimiothérapie) permettent d'éradiquer la majorité, voire la totalité, des cellules cancéreuses mais dans certains cas, quelques cellules résistent et survivent à ces traitements, prolifèrent et créent de nouveaux foyers à partir desquels émergent de nouvelles cellules cancéreuses (Aguirre-Ghiso, 2007).

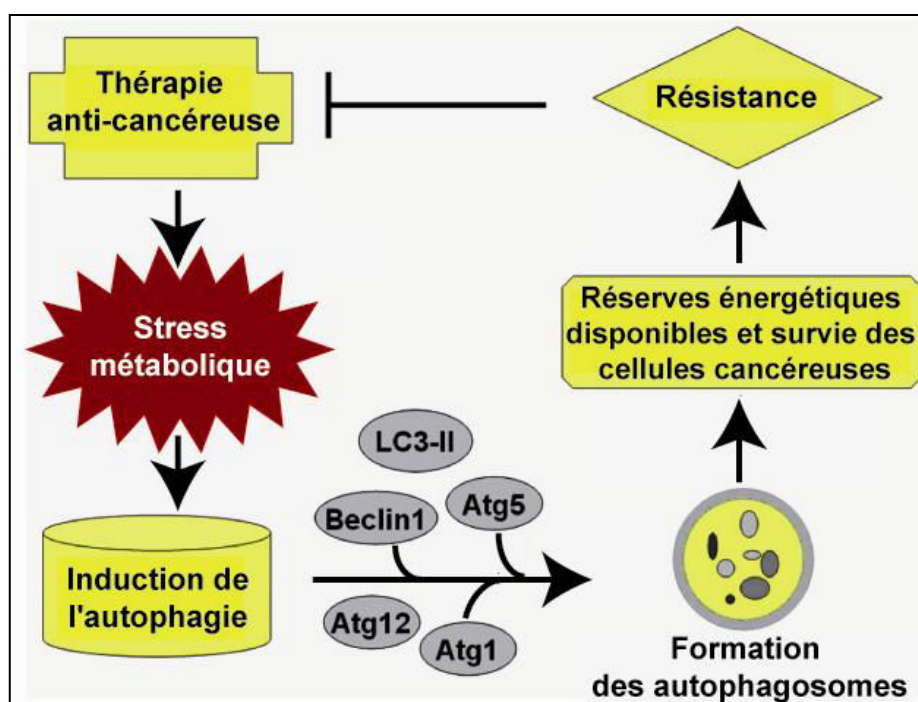


Figure 16 : Induction d'une résistance aux drogues anti-cancéreuses due à l'autophagie. Les cellules cancéreuses survivent aux stress métaboliques induits par les agents anti-cancéreux *via* la dégradation de constituants cellulaires par l'autophagie. Cela leur permet de maintenir un niveau d'énergie nécessaire à leur survie. D'après Chen *et al.*, 2010.

Cette apparition de résistance implique donc la recherche de nouveaux traitements ou l'association de plusieurs composés et donc l'accumulation des éventuels effets secondaires liés à ces différentes molécules. Plusieurs mécanismes de résistance aux drogues anti-cancéreuses ont été décrits tels que la régulation négative de l'apoptose, les mécanismes responsables du transport des drogues, la réparation de l'ADN ou la modification des sites d'action des drogues et leur pharmacocinétique (Liu *et al.*, 2011).

Récemment, l'autophagie a été décrite comme un facteur important pouvant favoriser la survie de ces cellules résistantes. Chen et collaborateurs ont décrit un modèle de résistance

aux drogues anti-cancéreuses médiée par l'autophagie (Figure 16) (Chen *et al.*, 2010). Les traitements utilisés en cancérothérapie, tels que la chimiothérapie, la radiothérapie, les inhibiteurs des tyrosines kinases ou la thérapie utilisant des anticorps dirigés contre des protéines marqueurs de la progression tumorale, induisent un stress métabolique et cytotoxique auxquels les cellules non résistantes sont très sensibles et répondent par une entrée dans un processus de mort cellulaire ou d'arrêt du cycle cellulaire. Les cellules résistantes, quant-à elles, restent insensibles à ce stress médié par les agents thérapeutiques car elles utilisent l'autophagie afin de survivre face aux stress induits par les agents anti-cancéreux (Chen *et al.*, 2010). Dans ces cas particuliers, l'inhibition de l'autophagie peut être considérée comme une approche thérapeutique dans les traitements anti-cancéreux. Plusieurs études ont démontré, d'une part, que l'activation de l'autophagie en réponse aux traitements anti-cancéreux est favorable pour la survie de ces cellules et, d'autre part, que l'inhibition de l'autophagie permet une resensibilisation des cellules résistantes et améliore donc l'efficacité des traitements utilisés (Figure 17).

En effet, une étude a montré que le traitement de cellules de cancer du sein par le Trastuzumab, un anticorps dirigé contre la protéine HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) surexprimée dans ces cellules, conduit à l'induction de l'autophagie et permet la survie de ces cellules (Najbauer *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que l'inhibition de l'autophagie par des composés chimiques tels que le 3-MA, le LY294002 ou la Bafilomycine A1, ou par l'utilisation de siRNA dirigés contre le gène *lc3*, diminue significativement la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses résistantes au Trastuzumab (Najbauer *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été démontré que l'autophagie est responsable également de l'apparition d'une résistance aux traitements de cancers du sein par le tamoxifène ou le bortezomib (John *et al.*, 2008; Milani *et al.*, 2009; Qadir *et al.*, 2008).

D'autres études ont montré des effets similaires dans des cellules de cancer du colon. Ces cellules, lorsqu'elles sont traitées par le 5-FU (5-Fluorouracil), présentent un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0/G1, une induction de l'apoptose et une induction de l'autophagie qui serait responsable de la survie de ces cellules. Mais si le traitement est associé aux composés 3-MA ou hydrochloroquine, l'effet du 5-FU est restauré et augmenté (Li *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2010).

Une autre étude très récente, portant sur le traitement du cancer de l'œsophage, a montré qu'après traitement des cellules par le 5-FU et le cisplatine, les cellules sensibles à ces traitements meurent par apoptose alors que les cellules résistantes sont positives pour l'autophagie et présentent une morphologie caractéristique de la mort par autophagie (O'Donovan *et al.*, 2011). L'utilisation d'inhibiteurs chimiques de l'autophagie (3-MA, Chloroquine ou Bafilomycine A1) n'a aucun effet sur la cytotoxicité des molécules utilisées. En revanche, l'extinction de gènes de l'autophagie comme *beclin 1* et *atg7* augmente significativement les effets des drogues utilisées et diminue la résistance des cellules à ces drogues (O'Donovan *et al.*, 2011). L'autophagie a également été décrite pour être responsable de la résistance de plusieurs cellules cancéreuses (cancer du sein, du pharynx, du poumon, du col de l'utérus et des cancers colorectaux) à la radiothérapie (Apel *et al.*, 2008).

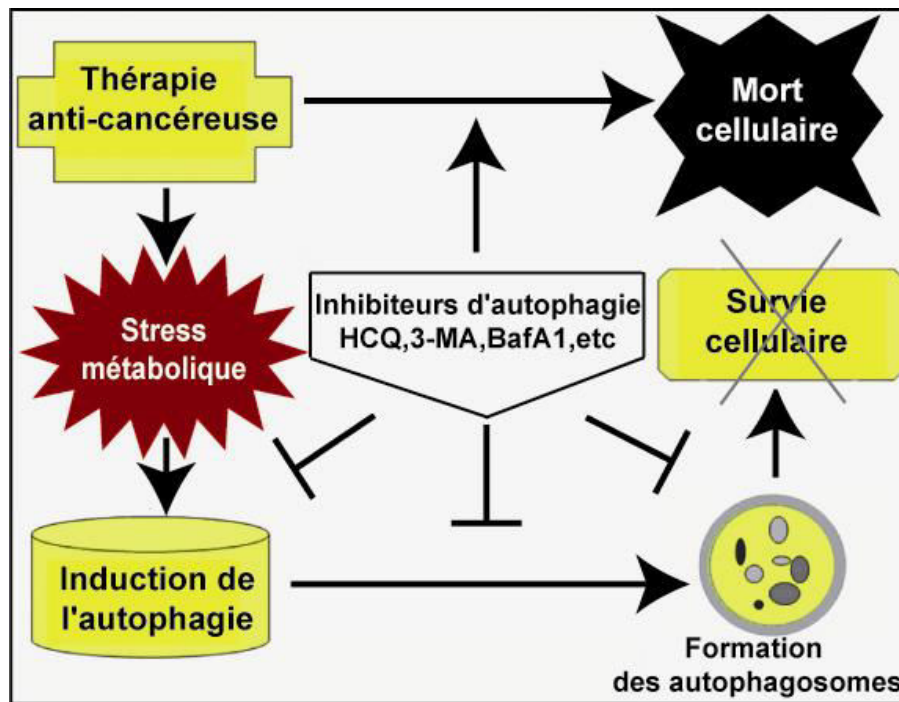


Figure 17: Les inhibiteurs de l'autophagie resensibilisent les cellules cancéreuses aux thérapies anti-cancéreuses. L'inhibition de l'autophagie par l'hydrochloroquine (HCQ), la 3-Méthyladénine (3-MA) ou la Bafilomycine A1 (BafA1) inhibe la survie des cellules cancéreuses et favorise les effets des traitements anti-cancéreux. D'après Chen *et al.*, 2010.

La recherche de nouvelles molécules impliquées dans l'apparition de ces phénomènes de résistance constitue donc une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement de certains cancers résistants. Par exemple, il a été démontré que les cellules issues de patients atteints de leucémies (HL-60 et Jurkat) sécrètent la protéine HMGB1 (*High-mobility group box 1*) suite aux traitements anti-cancéreux. Les protéines HMGB1, exogène ou sécrétée après traitement,

activent l'autophagie, ce qui conduit à l'apparition d'une résistance vis-à-vis des traitements utilisés (Liu *et al.*, 2010). En effet, la protéine HMGB1 induit l'autophagie en augmentant l'interaction de Beclin1 avec la PI3K et en favorisant la formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16. L'inhibition de cette voie de signalisation par des inhibiteurs chimiques ou par la technique des siRNA ainsi que les traitements avec des anticorps dirigés contre la protéine HMGB1 inhibent l'autophagie induite par HMGB1 et en conséquence resensibilisent les cellules aux traitements utilisés (Liu *et al.*, 2010). Par ailleurs, une étude très récente a démontré que l'inhibition de l'autophagie, par la 3-MA ou par l'extinction du gène *beclin1*, potentialise l'effet du paclitaxel dans l'induction de l'apoptose dans plusieurs lignées cancéreuses humaines telles que les cellules de cancer du poumon, du colon et de la prostate (Xi *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces résultats suggère que des inhibiteurs de l'autophagie pourraient être utilisés en association avec des traitements anti-cancéreux déjà existants dans le cas d'apparition de résistance à ces traitements. Certaines molécules, telle que l'hydrochloroquine, sont d'ailleurs déjà utilisées dans des essais cliniques (Chen *et al.*, 2010).

Les acteurs de la voie autophagique constituent donc de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des cancers.

Matériels et méthodes

I-Biologie moléculaire

1)-Vecteurs

Tous les vecteurs utilisés au cours de ce travail sont répertoriés dans le tableau 3.

1.1)-Vecteurs commerciaux

Les vecteurs commerciaux pEGFP-C1 et pEGFP-N3 (Clontech, 6084-1 et 6080-1) comportent un site de multi-clonage en amont ou en aval de l'ADNc de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) respectivement, une origine de réplication, un gène de résistance à la néomycine et à son analogue G418, et un gène de résistance à la kanamycine. Ces vecteurs ont été utilisés pour cloner les ADNc *gabapap* et *gabapab11* en phase avec la séquence codant la GFP afin d'obtenir les vecteurs recombinants pGFP-GABARAP, pGABARAP-GFP, pGFP-GABARAPL1 et pGABARAPL1-GFP. Les vecteurs pGABARAPL1-GFP et pGABARAP-GFP obtenus ont ensuite été utilisés pour construire, par mutagenèse dirigée, les vecteurs pGABARAPL1-G116A-GFP et pGABARAP-G116A-GFP, respectivement.

Le plasmide pOG44 (Invitrogen, V6005-20) code la Flp recombinase issue de *Saccharomyces cerevisiae*. Il comporte également un gène de résistance à l'ampicilline. Ce vecteur a été utilisé lors de la création des lignées cellulaires stables HEK293:FLAG-GABARAPL1-6his et HEK293:FLAG-GABARAPL1-G116A-6his à partir de la lignée parentale Flp-in-HEK293 (Invitrogen, R75007).

Toutes les cartes des vecteurs commerciaux utilisés sont fournies en annexe.

1.2)-Vecteurs disponibles au laboratoire ou obtenus d'autres laboratoires

Les vecteurs pGFP-LC3, pDsRed-LC3 et pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6his, ont été obtenus auprès des laboratoires du Dr. Zvunlun Elazar (Weizmann Institute, Israël), du Dr. Iovanna (Marseille, France) et du Dr. Yoshimori (Osaka University, Japon), respectivement.

Le vecteur pGEX4T2-GABARAP codant la protéine de fusion GST-GABARAP a été gracieusement fourni par le Dr. Olsen (University of California, USA).

Les vecteurs pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP et pDsRed-GABARAPL1 ont été précédemment obtenus au sein de notre laboratoire. Ces vecteurs expriment les protéines GFP-GABARAPL1, GABARAPL1-GFP et DsRed-GABARAPL1 et portent des gènes de résistance à la kanamycine (pGFP) ou l'ampicilline (pDsRed). Ils comportent également un gène de résistance au G418. Le vecteur ps701ts-ori-SV40gT, généreusement

fourni par le Dr. Feunteun (Institut Gustave Roussy, Paris), exprime l'antigène grand T du virus SV40. Ce vecteur a été utilisé pour établir la lignée immortalisée MEF:GABARAP^{-/-}.

Le vecteur pCDNA5.1/FRT:FLAG-GABARAPL1-G116A-6his a été obtenu par mutagenèse dirigée à partir du vecteur pCDNA5.1/FRT:FLAG-GABARAPL1-6his, disponible au laboratoire. Ce vecteur comporte les gènes de résistance à l'ampicilline et à l'hygromycine. Il a été utilisé pour créer la lignée stable HEK293 surexprimant la protéine mutante FLAG-GABARAPL1-G116A-6his.

Plasmides	Provenance	Protéine exprimée	Antibiotiques de sélection
pEGFP-C1	Clontech	GFP	Kanamycine/G418
pEGFP-N3	Clontech	GFP	Kanamycine/G418
pGFP-GABARAPL1	Construit au laboratoire	GFP-GABARAPL1	Kanamycine/G418
pGABARAPL1-GFP	Fourni	GABARAPL1-GFP	Kanamycine/G418
pOG44	Invitrogen	Flp recombinase	Ampicilline
pGFP-LC3	Fourni	GFP-LC3	Kanamycine/G418
pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6HIS	Fourni	Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6his	Ampicilline
pDsRed-LC3	Fourni	DsRed-LC3	Ampicilline/G418
pGEX4T2-GABARAP	Fourni	GST-GABARAP	Ampicilline
pDsRed-GABARAPL1	Disponible au laboratoire	DsRed-GABARAPL1	Ampicilline/G418
ps701ts-ori-SV40gT	Fourni	Protéine grand T du SV40	Ampicilline/Zéocine
pCDNA5.1/FRT:FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS	Disponible au laboratoire	FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS	Ampicilline/Hygromycine
pCDNA3.1:FLAG-GABARAPL1-6HIS	Disponible au laboratoire	FLAG-GABARAPL1-6HIS	Ampicilline/Hygromycine
pGABARAP-GFP	Construit au cours de ce travail	GABARAP-GFP	Kanamycine/G418
pGFP-GABARAP	Construit au cours de ce travail	GFP-GABARAP	Kanamycine/G418
pGABARAPL1-G116A-GFP	Construit au cours de ce travail	GABARAPL1-G116A-GFP	Kanamycine/G418
pGABARAP-G116A-GFP	Construit au cours de ce travail	GABARAP-G116A-GFP	Kanamycine/G418

Tableau 3 : Liste des vecteurs utilisés.

Le vecteur pcDNA3.1:FLAG-GABARAPL1-6HIS a été construit au laboratoire. Ce vecteur comporte les gènes de résistance à l'ampicilline et à l'hygromycine. Il a été utilisé pour créer la lignée stable MDA-MB231 surexprimant la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS.

1-3)-Vecteurs construits pour ce travail de thèse

pGABARAP-GFP et pGFP-GABARAP

Ces vecteurs codent les protéines de fusion GFP dans lesquelles la protéine GABARAP a été placée en amont ou en aval de la GFP. Pour construire ces différents vecteurs, l'ADNc de *gabapap* a été amplifié par PCR à partir du vecteur pGEX4T2-GABARAP. Les amorces spécifiques comportant des sites de restriction définis sont décrites dans le tableau 4. Les fragments PCR ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction citées dans le tableau puis clonés en phase avec la séquence du gène de la GFP dans les vecteurs pEGFP-C1 et pEGFP-N3. Les vecteurs recombinants ont ensuite été vérifiés par séquençage (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3130).

pGABARAPL1-G116A-GFP et pGABARAP-G116A-GFP

Les vecteurs pGABARAPL1-G116A-GFP et pGABARAP-G116A-GFP ont été obtenus par mutagenèse dirigée à partir des vecteurs pGABARAPL1-GFP et pGABARAP-GFP, respectivement selon le protocole décrit ci-après.

2)-Protocoles

2.1)-Amplification d'ADN par PCR

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL de tampon de réaction contenant 200 µM de dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl₂, 15 ng de matrice ADN et 1 U de *GoTaq* polymérase (Promega, M8305). Les mélanges réactionnels ont ensuite été placés dans un thermocycleur (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700). Le programme utilisé pour l'amplification de l'ADNc *gabapap* comprend une étape de 2 min à 92°C puis 30 cycles composés d'une étape de dénaturation pendant 30 s à 92°C, d'une étape d'hybridation pendant 30 s à 55°C et d'une étape d'élongation pendant 1 min et 30 s à 72°C.

2.2)-Electrophorèse sur gel d'agarose

Après dilution dans un tampon de charge 1X (3 mM Bleu de bromophénol, 1.5 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 8) et chargement sur un gel d'agarose 1 %, les fragments PCR ont migré à 50 V pendant 40 min dans un tampon TAE (40 mM Tris-acétate pH 8, 1 mM EDTA). L'ADN a été révélé par un bain de 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET) (0,5 µg/ml). Le marqueur de taille utilisé est le 1 kb DNA Ladder Plus (Invitrogen, 10787018).

2.3)-Clonage des fragments PCR

Les fragments PCR ou les vecteurs plasmidiques ont été incubés pendant 2 h à 37°C avec 1 unité d'enzyme par microgramme d'ADN dans le tampon indiqué par le fournisseur (Fermentas). Après séparation des produits de digestion par électrophorèse selon le protocole décrit précédemment, les fragments correspondant aux vecteurs et aux inserts digérés ont été découpés et purifiés avec le Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, 740609) selon les recommandations du fournisseur. Les ligatures des fragments PCR et des vecteurs pEGFP-C1 et pEGFP-N1 digérés ont été effectuées pendant 1 nuit à 4°C en présence de 50 ng de vecteur, 150 ng du produit de PCR et 1 unité de T₄ ADN ligase (Fermentas, EL0011) dans le tampon de réaction recommandé par le fournisseur (Fermentas).

2.4)-Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries *E. coli* compétentes (50 µl de JM109) ont été incubées pendant 30 min sur glace avec 10 à 100 ng d'ADN de la réaction de ligature. Un choc thermique à 42°C a été réalisé pendant 1 min puis les bactéries ont été replacées sur glace pendant 2 min. Les bactéries ont ensuite été incubées pendant 2 heures à 37°C dans 950 µl de milieu Luria Bertani [1% (p/v) Tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 1% (p/v) NaCl] puis étalées sur milieu sélectif gélosé composé de LB-Agar (15 g/l) contenant de la kanamycine (50 µg/ml) ou de l'ampicilline (100 µg/ml). Après 24 h à 37°C, les colonies bactériennes ont étéensemencées dans 3 ml de milieu LB pendant 24 h à 37°C puis l'ADN plasmidique a été purifié par le protocole de lyse alcaline décrit ci-dessous.

2.5)-Mini-préparation d'ADN plasmidique

Après centrifugation, le culot bactérien a été repris dans 100 µl d'une solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Hcl pH 8, 10 mM EDTA) puis dans 200 µl de la solution II (0,2 N NaOH , 1% SDS) et 150 µl d'une solution III (5M acétate de sodium, 11.5 % acide acétique

glacial). L'ADN plasmidique a ensuite été purifié par extraction phénolique, lavé et précipité à l'éthanol puis repris dans 50 µl d'eau ultrapure.

2.6)-Séquençage

Le séquençage des ADN plasmidiques a été réalisé par Fabrice Poncet (Plateforme séquençage, IFR133) selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) au moyen d'un séquenceur automatique (Applied Biosystems, Genetic Analyser 3130).

2.7)-Maxi-préparation d'ADN plasmidique

La purification des plasmides a été effectuée à partir de 200 ml de culture bactérienne d'une nuit à 37°C et sous agitation. L'extraction a été effectuée avec le kit Maxi-HiSpeed (Quiagen, 12662) selon les recommandations du fournisseur.

Nom amorce	Matrice	Séquence	Application / Sites restriction
For-GABARAP- <i>BglIII</i>	pGEX4T2-GABARAP	5'-tttttagatctaaagtcgtgtacaaagaag-3'	Clonage / <i>BglIII</i>
Rev-GABARAP- <i>EcoRI</i>	pGEX4T2-GABARAP	5'-ctgctttcacagatgccagacattattccggttttt-3'	Clonage / <i>EcoRI</i>
For-GABARAP- <i>XhoI</i>	pGEX4T2-GABARAP	5'-tttttctcagatgaagtcgtgtacaaagaag-3'	Clonage / <i>XhoI</i>
Rev-GABARAP- <i>SacII</i>	pGEX4T2-GABARAP	5'-ctgctttcacagatgccagacggcgcttttt-3'	Clonage / <i>SacII</i>
For-GABARAPL1GA-GFP	pGABARAPL1-GFP	5'-cctatagtgatgagagtgctatgccaaaccggggcccg-3'	Mutagenèse dirigée
Rev-GABARAPL1GA-GFP	pGABARAPL1-GFP	5'-cccggggcccggtttcgcgatagactctcatcactatag-3'	Mutagenèse dirigée
For-GABARAPGA-GFP	pGABARAP-GFP	5'-gaaagtgtctacgctctgccgcgccc-3'	Mutagenèse dirigée
Rev-GABARAPGA-GFP	pGABARAP-GFP	5'-ggcccgcggcagagcgtagacacttc-3'	Mutagenèse dirigée

Tableau 4 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR. Les sites de restriction inclus dans les amorces sont soulignés.

3)-Mutagenèse dirigée

Les vecteurs pGABARAPL1-G116A-GFP et pGABARAP-G116A-GFP ont été construits par la technique de mutagenèse dirigée. Cette technique est basée sur l'utilisation de deux oligonucléotides complémentaires contenant le codon muté et s'hybridant sur chacun des deux brins du plasmide d'intérêt utilisé comme matrice. Après amplification par la *pfu* DNA polymérase du fragment, l'ADN parental est digéré par l'enzyme *DpnI* (Fermentas, ER1701) digérant spécifiquement l'ADN plasmidique bactérien méthylé utilisé comme matrice. Cette enzyme ne digère donc pas les brins néosynthétisés par PCR qui seront ensuite utilisés pour la transformation de bactéries compétentes. Dans les protéines de fusion GABARAPL1-GFP et GABARAP-GFP, la glycine116, codée par les codons GGG et GGT, a

été remplacée par une alanine codée par les codons GCG ou GCT. Pour ces expériences, nous avons utilisé le kit commercial de Stratagène (200521) selon les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées pour créer les mutations ponctuelles sont décrites dans le tableau 6. Brièvement, les réactions PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 μ L de tampon 1X *pfu* ultra AD contenant 10 mM de dNTP, 10 ng de matrice (ADN plasmidique), 10 μ M de chaque amorce et 1 U de *pfu* ultra AD. Le programme utilisé comprend une étape de 2 min à 95°C puis 18 cycles composés d'une étape de dénaturation pendant 30 s à 95°C, d'une étape d'hybridation pendant 1 min à 55°C et d'une étape d'élongation pendant 6 min à 72°C. 40 μ l des produits de PCR ont ensuite été digérés par l'enzyme *DpnI* pendant 2 h à 37°C dans le tampon recommandé par le fournisseur (Fermentas). Les ADN digérés (15 μ l) ont ensuite été incubés avec 100 μ l de bactéries JM109 compétentes comme cela a été décrit précédemment. Les plasmides amplifiés ont été extraits par lyse alcaline, analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et la présence des mutations ponctuelles dans les différents vecteurs recombinants a été confirmée par séquençage.

II-Culture cellulaire

1)-Entretien des cellules

La lignée cellulaire Flp-in-HEK293 (*Human Embryonic Kidney cells*, cellules humaines embryonnaires de rein, Invitrogen, R75007) est une lignée stable contenant le vecteur pFRT/*lacZeo* intégré au sein de son génome. Ce vecteur contient un site FRT (*Flp recombination target* issu de *Saccharomyces cerevisiae*) et un gène de fusion *lacZ/zéocine* codant la β -galactosidase et une résistance à un antibiotique, la zéocine.

Les cellules Flp-in-HEK293 et les cellules MDA-MB231 (*MD Anderson Hospital-Bruce Mackay*, cellules humaines dérivées de cancer du sein) ont été cultivées dans un milieu complet DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, Invitrogen, 11880) additionné de 10 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Invitrogen, 10270-106), 1 % de L-glutamine (Invitrogen, 25030-032) et un cocktail d'antibiotiques (100 μ g /ml pénicilline, 100 μ g/ml streptomycine et 0,25 μ g/ml amphotéricine B, Invitrogen, 15140 et 15290).

Les cellules MCF7 (*Michigan Cancer Foundation*, cellules humaines dérivées de cancer du sein) ont été cultivées dans un milieu DMEM supplémenté de 5 % de SVF, 1 % de L-glutamine et un cocktail d'antibiotiques (100 U/ml pénicilline, 100 μ g/ml streptomycine et 0,25 μ g/ml amphotéricine B).

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C et en atmosphère humide à 5% de CO₂ et sous-cultivées deux fois par semaine. Pour cela, les cellules ont été lavées avec 3 ml de Hank's-EDTA 0,03% puis décrochées de leur support à l'aide de trypsine. Après élimination du Hank's-EDTA, les cellules ont été incubées avec 2 ml de trypsine et placées à 37°C pendant 10 min. L'action de la trypsine a été ensuite inhibée par ajout de 8 ml de milieu frais puis les cellules ont été comptées sur cellule de Malassez afin d'ensemencer la quantité nécessaire de cellules dans 10 ml de milieu complet dans une nouvelle boîte de culture.

2)-Congélation et décongélation

Les cellules ont été congelées à partir de subcultures atteignant 60 % de confluence. Les cellules ont été décollées par la trypsine, centrifugées à 115 g pendant 10 min puis le culot cellulaire a été repris dans 1 ml de milieu de congélation (50 % DMEM, 40 % SVF, 10 % DMSO). Les cellules ont ensuite été placées dans des cryotubes puis dans une boîte de congélation (Nalgen, 5100-0001) contenant de l'isopropanol, elle-même placée à -80°C afin de permettre une baisse progressive de température et donc une congélation lente des cellules. Le lendemain, les cryotubes ont été placés dans des tanks à azote liquide d'une température de -196°C pour permettre un stockage de longue durée des lignées cellulaires.

Pour la décongélation, les cryotubes ont été placés, dès la sortie de l'azote liquide, dans un bain marie à 37°C. Une fois la suspension cellulaire décongelée, les cellules ont été transférées dans 10 ml de milieu complet, centrifugées à 115 g pendant 10 min puis le culot cellulaire a été repris dans 10 ml de milieu complet et placé dans une boîte de 10 cm de diamètre. Le lendemain, le milieu de culture a été éliminé puis remplacé par 10 ml de milieu complet.

3)-Transfection cellulaire

3.1)-Transfection transitoire

Les cellules HEK293 ont été transfectées par les vecteurs suivants : pEGFP, pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP et pDsRed-GABARAPL1. Les cellules ont été transfectées avec 500 ng de vecteur et 1 µl de liposomes Transfast (Promega, E2431) selon les recommandations du fournisseur. Après 1 h d'incubation avec les complexes ADN-liposomes, le milieu de transfection a été remplacé par 3 ml de milieu complet puis les cellules ont été de nouveau placées à 37°C pendant 48 h.

Les cellules MEF:ATG5^{-/-} et sauvages (gracieusement fournies par le Pr. Mizushima, Tokyo Medical and Dental University) ont été transfectées par le vecteur pDsRed-GABARAPL1 à l'aide de Transfast comme décrit précédemment.

Pour les expériences de western-blotting, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 400 000 cellules par puits, transfectées le jour suivant puis récoltées 48 h après la transfection.

Pour les expériences de microscopie confocale, les cellules ont été, soitensemencées dans des chambres à deux puits Lab-Tek à raison de 80 000 cellules par puits, soit sur des lamelles de verre dans des plaques de 6 puits à raison de 400 000 cellules par puits. Les cellules ont été transfectées le jour suivant puis analysées 48 h après la transfection.

3.2)-Transfection stable

Pour les transfections stables, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de 10 cm de diamètre à raison de 10⁶ cellules par boîte. Le jour suivant, les cellules ont été transfectées avec 20 µg de vecteur et 40 µg de transfast. Après 3 h d'incubation avec les cellules, les complexes ADN-liposomes ont été remplacés par 8 ml de milieu complet puis les cellules ont été de nouveau placées à 37°C. Le jour suivant, les cellules ont été trypsinées puisensemencées dans trois nouvelles boîtes de 10 cm de diamètre à des dilutions différentes (1/10^{ème}, 1/3 et 1/2).

A partir de cette étape, les cellules ayant intégré le plasmide d'intérêt dans leur génome ont été sélectionnées dans du milieu complet contenant l'antibiotique de sélection jusqu'à l'apparition de clones stables. Les clones isolés ont ensuite été prélevés etensemencés successivement dans des plaques de 24 puits, de 6 puits puis dans des boîtes de 10 cm de diamètre. L'expression des protéines d'intérêt dans les différents clones a ensuite été testée par western-blotting et seuls les clones positifs ont été retenus et maintenus en culture dans du milieu complet supplémenté de 100 µg/ml d'antibiotique de sélection.

4)-Lignées cellulaires établies

Au cours de ce travail de thèse, j'ai établi plusieurs lignées cellulaires stables décrites ci-dessous et surexprimant pour la plupart d'entre elles des protéines de fusion GABARAPL1.

4.1)-HEK293:Flag-GABARAPL1-G116A-6his

Cette lignée à été obtenue grâce au système Flp-in développé par la société Invitrogen. Ce système permet d'obtenir rapidement des clones stables en facilitant l'intégration d'un transgène au niveau d'une position spécifique du génome des cellules HEK293 contenant des sites de recombinaison FRT à l'aide de la Flp recombinase surexprimée dans les cellules lors de la transfection. La lignée Flp-in-HEK293 a donc été co-transfectée par 2 µg du vecteur recombinant pcDNA5/FRT-Flag-GABARAPL1-G116A-6his et 18 µg du vecteur pOG44 codant la Flp recombinase en présence de Transfast. La sélection des clones stables a été effectuée en présence de 400 µg/ml d'hygromycine puis les clones positifs ont été maintenus dans du milieu complet additionné de 100 µg/ml d'hygromycine.

4.2)-HEK293:GFP et HEK293:GFP-GABARAPL1

Les lignées HEK293 surexprimant la protéine GFP ou GFP-GABARAPL1 ont été établies par transfection stable à partir des cellules HEK293 et des vecteurs pEGFP-C1 et pGFP-GABARAPL1, respectivement. La sélection des clones stables a été réalisée en présence de 400 µg/ml de G418 puis les clones positifs ont été cultivés dans du milieu complet additionné de 100 µg/ml de G418.

4.3)-HEK293:DsRed-GABARAPL1 et MCF-7:DsRed-GABARAPL1

Les lignées HEK293 et MCF7 surexprimant la protéine de fusion DsRed-GABARAPL1 ont été établies par transfection stable à partir des cellules HEK293 et MCF7 et du vecteur pDsRed-GABARAPL1. La sélection des clones stables a été réalisée en présence de 400 µg/ml de G418 puis les clones positifs ont été cultivés dans du milieu complet additionné de 100 µg/ml de G418.

4.3)-MDA-MB231:FLAG-GABARAPL1-6his

La lignée MDA-MB231 surexprimant la protéine de fusion FLAG-GABARAPL1-6his a été établie par transfection stable des cellules MDA-MB231 par le vecteur pcDNA3.1:Flag-GABARAPL1-6his. La sélection des clones stables a été effectuée en présence de 400 µg/ml d'hygromycine puis les clones positifs ont été maintenus dans du milieu complet additionné de 100 µg/ml d'hygromycine.

5)-Immortalisation des cellules MEFs:GABARAP^{-/-}

Les cellules MEF:GABARAP^{-/-} ont été obtenues à partir de souris *knock-out* 129/SvEv-C57BL/6 dans lesquelles le gène *gabarap* a été invalidé par la technique du *gene trap* (O'Sullivan *et al.*, 2005). Ces souris nous ont été gracieusement envoyées par le Pr. Heinrich Betz (Max-Planck Institute for Brain Research, Allemagne).

5.1)-Isolement des MEF

Les cellules ont été extraites à partir d'embryons au stade E14,5. Pour cela, les embryons ont été isolés puis débarrassés du cœur et du foie ainsi que de la tête. Ils ont ensuite été lavés 3 fois avec du PBS 1X stérile (0,17 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) puis incubés par groupe de 4 embryons dans 12 ml d'une solution glaciale de 0,25 % trypsine-0,02 % EDTA (soit l'équivalent de 3 ml de trypsine par embryon) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les embryons ont été incubés pendant 30 min à 37°C dans deux volumes de solution de trypsine puis 8 ml de milieu de culture frais ont été ajoutés. Les tissus ont alors été homogénéisés puis laissés sédimenter par gravité pendant 1 min. Le surnageant a alors été transféré dans un nouveau tube. Cette opération d'homogénéisation a été reproduite une deuxième fois puis le surnageant a été additionné au précédent. Les cellules ont ensuite étéensemencées dans plusieurs boîtes de 10 cm de diamètre.

Les cellules MEF:GABARAP^{-/-} ont été cultivées dans du milieu complet (DMEM additionné de 10% SVF, 1% L-glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 0,25 µg/ml amphotéricine B) à 37°C et 5% de CO₂ sous atmosphère humide pendant les stades primaires (passages 1 à 5). A chaque passage, une partie de ces cellules a été congelée dans de l'azote liquide pour conservation selon le protocole décrit précédemment et une autre partie a été utilisée pour les protocoles d'immortalisation spontanée et d'immortalisation par l'antigène T du SV40 décrits ci-dessous.

5.2)-Immortalisation spontanée des MEF

L'immortalisation spontanée des cellules MEF:GABARAP^{-/-} consiste en une série de passages de ces cellules leur permettant d'acquérir au cours des différentes divisions cellulaires des mutations pouvant affecter leur cycle cellulaire. Un autre élément très important dans ce processus d'immortalisation spontanée est l'activité de la télomérase, une enzyme nécessaire pour le maintien de la longueur des chromosomes. Ainsi, les cellules

s'immortalisant spontanément voient leur cycle cellulaire dérégulé et la longueur de leurs télomères stabilisée.

Le protocole d'immortalisation spontanée utilisé est similaire à celui décrit par Aaronson et Todaro (Aaronson & Todaro, 1968). Brièvement, le milieu de culture a été éliminé, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X puis trypsinées. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 115 g pendant 10 min, comptées puisensemencées à une concentration de 380 000 cellules par flasque de 25 cm². Ce protocole a été répété tous les 3 jours jusqu'au passage 22 puis les cellules ont été passées tous les 6 jours jusqu'à l'activation de leur prolifération signifiant leur immortalisation.

5.3)-Immortalisation des MEF par l'antigène grand T du virus SV40

Brièvement, des cellules MEF primaires (10⁶) ont été transfectées de manière stable par le vecteur codant l'antigène grand T du virus SV40 (*Simian Virus 40*, 20 µg) et le composé de transfection Jet Prime (40 µl, Polyplus transfection, 114-07) selon les recommandations du fournisseur. Le jour suivant, les cellules ont été trypsinées etensemencées en plusieurs boîtes de 10 cm de diamètre comme cela a été décrit dans le paragraphe 3.2 "Transfection stable". Les clones stables ont ensuite été isolés et l'expression de la protéine grand T du virus SV40 a été vérifiée par western-blotting. Cette protéine étant thermolabile, les cellules ont été cultivées à 33°C pendant toute la durée du protocole.

6)-Test de viabilité cellulaire

Ce test repose sur l'action enzymatique des protéines mitochondriales à activité succinate déshydrogénase (SDH) dépendante des cofacteurs NADH et NADPH des cellules vivantes (Mosmann, 1983). Ces enzymes sont capables de métaboliser le sel de tétrazolium dénommé MTT [1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, Thiazolyl blue formazan, Sigma, M2003] de couleur jaune initiale en un produit de couleur violette, le formazan. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde comprise entre 490 et 600 nm.

Les cellules MCF-7 parentales et MCF-7:Flag-GABARAPL1-6HIS surexprimant la protéine GABARAPL1 ont étéensemencées dans du milieu complet (100 µl par puits) en 10 plaques de 96 puits à raison de 2 000 cellules par puits. Tous les jours suivant l'ensemencement, le nombre de cellules présentes dans chaque puits d'une plaque a été quantifié. Pour cela, 50 µl de MTT (1 mg/ml) dilué dans une solution de dilution (Hank's, 1 % Phenazine MethoSulfate) ont été ajoutés dans chaque puits. Après 2 h d'incubation à 37°C

en atmosphère humide contrôlée en CO₂ (5%), l'intensité de la couleur violette a été estimée par mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (ELX800 Bio-Tek instruments).

7)-Traitement chimiques des cellules

Pour toutes les stimulations, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 500 000 cellules par puits. A 70% de confluence, les cellules ont été traitées par les différents composés cités dans le tableau 5. Les concentrations de chaque composé et la durée des traitements sont décrites dans le tableau 5.

7.1)-Inducteurs et inhibiteurs de l'autophagie

Le processus d'autophagie est caractérisée par la formation de vésicules intracellulaires appelées autophagosomes englobant une partie du cytosol. Ces vésicules fusionnent ensuite avec les lysosomes pour induire la dégradation de leur contenu et son recyclage. L'autophagie est donc la somme de deux flux intracellulaires correspondant : 1) à la formation des vésicules et, 2) à leur dégradation après fusion avec les lysosomes. Les molécules incorporées dans ces vésicules, telle que p62, ou liées à ces vésicules, telle que GABARAPL1, suivent donc également ce flux. Pour déterminer si une protéine est dégradée par autophagie, il convient donc soit : 1) d'activer l'autophagie, 2) inhiber la dégradation des vésicules dans les lysosomes ou, 3) activer et inhiber ces deux phénomènes.

Pour l'induction de l'autophagie, nous avons traité les cellules soit par l'EBSS (Earl's Balanced Salt Solution, Sigma, E3024) soit par la Rapamycine (Sigma, R8781) (Munafo & Colombo, 2001; Sarbassov *et al.*, 2006). L'EBSS est une solution saline dépourvue de nutriments qui entraîne une carence nutritionnelle et induit l'autophagie. La rapamycine quant à elle est un inhibiteur de l'activité de la kinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycine*). L'inhibition de mTOR permet l'hypophosphorylation d'ATG13 et donc l'induction de l'autophagie (Kamada *et al.*, 2000). Pour l'inhibition de la dégradation lysosomale, nous avons utilisé les composés suivants :

- **NH₄Cl** (Chlorure d'ammonium, Sigma, A0171) : un agent lysosomotropique qui inhibe l'action des protéases lysosomales par l'augmentation du pH intra-lysosomal (Poole *et al.*, 1977) (Bampton *et al.*, 2005) ;

- **Bafilomycine A1** (Sigma, B1793) : décrite pour bloquer les pompes V-ATP ases et inhiber la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yamamoto *et al.*, 1998) (Crider *et al.*, 1994) ;

- **E64d et Pepstatine** (Sigma, E8640 and P5318) : des inhibiteurs des enzymes lysosomales. La pepstatine inhibe les protéases acides telles que la pepsine, la rénine, la cathepsine D et les protéases B. L'E64d inhibe les calpaïnes et les protéases à thiol (Tamai *et al.*, 1986; Ueno *et al.*, 1999) (Umezawa *et al.*, 1970).

Afin d'étudier le flux autophagique, les cellules ont été traitées simultanément avec des inhibiteurs de l'activité lysosomale et des activateurs de l'autophagie. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de Bafilomycine A1 (200 nM pendant 12 h) puis avec de la Rapamycine (10 µM) ou de l'EBSS pendant 4 h supplémentaires. Le traitement par la Rapamycine (10 µM) ou l'EBSS en présence de E64d/Pepstatine (10 µg/ml) a été effectué pendant 4 h.

7.2)-Drogues anti-cancéreuses

Pour étudier la régulation de l'expression ou de la stabilité de la protéine GABARAPL1 dans les cellules cancéreuses, nous avons notamment traité ces cellules avec différentes molécules utilisées actuellement en thérapie anti-cancéreuse :

- **Bortezomib** (Euromedex, Sc217785) : un inhibiteur réversible du protéasome ;
- **Docetaxel** (Euromedex,D-1000) : un composé chimique qui inhibe la dépolymérisation des microtubules.

Composé	Action connue	Concentration	Durée (h)
Rapamycine	Inducteur de l'autophagie	10 µM	4
NH ₄ Cl	Inhibiteur des enzymes lysosomales	50 mM	2
BafilomycineA1	Inhibiteur des enzymes lysosomales	500 nM	24
E64d/pepstatine	Inhibiteur de l'activité lysosomale	10 µg/ml	4
Bortezomib	Inhibiteur du protéasome	25 nM	15
Docetaxel	Inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules	9 µg/ml	48

Tableau 5: Concentrations et durées des traitements des différentes molécules utilisées.

8)-Marquage des cellules et microscopie confocale

8.1)-Marquage des lysosomes

Les cellules HEK293 ou MCF7:DsRed-GABARAPL1 ont étéensemencées à raison de 80 000 cellules par puits dans des chambres Lab-Tek (Nunc, 663081). 48 heures après ensemencement, le milieu de culture a été éliminé puis remplacé avec du milieu complet frais contenant 50 nM de LysoTracker green (Invitrogen, L7526), un fluorophore spécifique des compartiments acides et plus particulièrement des lysosomes. Les cellules ont ensuite été placées à 37°C pendant 1 h puis observées par microscopie confocale à une longueur d'onde d'excitation de 504 nm et une longueur d'onde d'émission de 511 nm. L'ADN des noyaux des cellules a été marqué avec l'agent intercalant Hoechst 33258 (Sigma, 861405) (2 µg/ml) puis observé au microscope confocal à une longueur d'onde d'excitation de 343 nm et à une longueur d'onde d'émission de 405 nm.

8.2)-Microscopie confocale

Pour la microscopie confocale, les cellules ont été observées à l'aide du microscope Olympus FluoView FV1000 disponible au sein de la plateforme microscopie de l'IFR 133. Ce microscope comprend 4 lasers pouvant émettre des lumières d'excitation aux différentes longueurs d'ondes suivantes : 405, 458-488-514, 543 et 633 nm. Les longueurs d'ondes 405, 488 et 543 nm correspondent aux longueurs d'ondes d'excitation du Hoescht 33258, de la GFP et de la DsRed, respectivement. Les images ont été capturées à l'aide du logiciel FV-Viewer Olympus puis traitées avec le logiciel Adobe Photoshop 9.0.

III-Biochimie des protéines

1)-Extraction des protéines à partir de cellules

1.1)-Fractionnement sub-cellulaire

Six boîtes de culture de 10 cm de diamètre de cellules HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS ont étéensemencées à raison de 10⁶ cellules par boîte. Trois jours plus tard, trois boîtes ont été gardées dans du milieu complet et 3 boîtes ont été stimulées avec 50 mM NH₄Cl pendant 2 h. Les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X, collectées mécaniquement à l'aide d'un grattoir et centrifugées à 115 g pendant 10 min. Le culot a ensuite été repris dans 1 ml de Tampon de lyse (PBS 1X additionné de 25 mM PMSF) puis soniqué 4 fois pendant 5 s

(Sonics and Materials, USA) puis le lysat total a été centrifugé de nouveau à 115 g pendant 10 min pour sédimenter les noyaux.

Le surnageant a ensuite été soumis à une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 30 min puis le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et placé à 4°C alors que le culot a été repris dans 1 ml de Tampon de lyse, soniqué 4 fois pendant 5 s, puis de nouveau soumis à une étape d'ultracentrifugation. Finalement le culot a été repris dans 200 µl de Tampon de lyse. La concentration en protéines de chaque fraction a été déterminée par la méthode de Bradford avant conservation à -80°C.

1.2)-Lyse des cellules

Selon les expériences réalisées, deux protocoles d'extraction des protéines ont été utilisés.

Premier protocole : les cellules ont été poolées après trypsinisation puis centrifugées pendant 10 min à 115 g. Les culots ont ensuite été repris dans un volume approprié de Tampon de lyse SDSLB1X [SDS Loading Buffer, 78 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2,5 % SDS (p/v), 12,5 % glycérol (v/v), 6,25 % β-mercaptoéthanol (v/v), 0,025 % bleu de bromophénol (p/v)] puis les extraits protéiques ont été soniqués (30 pulses, Sonics and Materials, USA) et congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Second protocole : les cellules ont été lysées dans la boîte ou le puits de culture avec un Tampon de lyse (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Triton X100 1%) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma, P8340) pendant 15 min à 4°C sous agitation douce. Les cellules ont ensuite été récoltées puis centrifugées à 10 000 g pendant 10 min. La concentration en protéines du surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford avant conservation à -80°C.

2)-Extraction de protéines à partir de tissus

2.1)-Méningiomes

Lors de cette étude, nous avons analysé 22 méningiomes (21 de grade I et 1 de grade II) et 1 méninge saine obtenus de la Tumorothèque de Besançon. Les caractéristiques des méningiomes sont détaillées dans le tableau 7 dans la partie Résultats. Ces échantillons ont été prélevés par les neurochirurgiens du CHU Minjoz et placés dans une coupelle de liquide physiologique refroidi à 4°C avant congélation dans de l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à extraction des protéines totales.

2.2)-Tumeurs du sein

Lors de cette étude, nous avons analysé 10 biopsies de tumeurs du sein (50 mg environ) obtenues auprès du Centre Georges-François Leclerc (CGFL) de Dijon. Les tumeurs appartiennent à 4 sous-types différents : luminal A (2), luminal B (2), HER2 positive (4) et basal (2).

3)-Protocole d'extraction et de dosage des protéines

Pour l'extraction des protéines totales à partir de biopsies, 30 mg de tissu et le kit d'extraction Total RNA and Protein Isolation (Macherey-Nagel, 740933) ont été utilisés. L'extraction a été effectuée selon les recommandations du fournisseur. Ce kit permet l'extraction en parallèle des protéines et des ARN totaux. La concentration en protéines des échantillons a été déterminée grâce au kit BCA Protein Quantification Assay (Macherey-Nagel, 740967).

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en référence à une gamme de BSA (*Bovine Serum Albumin*) de concentrations connues. Brièvement, 800 μ l d'eau, 200 μ l du réactif de Bradford (Biorad, 500-0006) et 5 μ l d'échantillon ou la quantité appropriée en BSA ont été mélangés puis l'absorbance a été déterminée à la longueur d'onde de 595 nm.

4)-Western-blotting

Les protéines de chaque échantillon ont été préparées dans du tampon de charge SDSLB1X puis dénaturées pendant 3 min à 100°C avant d'être chargées sur un gel SDS-PAGE 12,5 ou 15 % à l'aide du système Mini Protean Gel III[®] (Biorad, 165-8001). La migration a été effectuée dans le tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-HCl; 0,2 M glycine; 0,1 % SDS) sous une tension de 100-200V.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride PVDF 0,2 μ M (Biorad, 162-0177) préalablement incubée dans du méthanol pendant 2 min. Le transfert a été effectué dans le tampon de transfert [10% méthanol (v/v) ; 25 mM Tris-HCl; 192 mM glycine] à 100V pendant 1 h et à froid à l'aide du système Mini Trans Blot[®] (Biorad, 170-3910). La membrane a ensuite été placée 1 h à température ambiante, sous agitation lente, dans une solution de saturation [TBS pH 7,4 (Tris 199 mM ; HCl qsp pH 7,4 ; NaCl 1,36 mM) Tween 0,1 % ; régilait 5 %]. Les anticorps primaires dilués

dans la solution de saturation ont été mis au contact des membranes pendant une nuit à 4°C. L'ensemble des anticorps primaires utilisés est décrit dans le tableau 6 ci-dessous.

Après 3 lavages au TBS-Tween 0,1%, les anticorps secondaires monoclonaux de chèvre anti-Ig de souris (Paris, BI2413C) et de chèvre anti-IgG de lapin (Paris, BI2407), tous les deux conjugués à la peroxydase de Raifort (dilués au 1/ 20 000^e) ont été mis en présence des membranes pendant 1 h à température ambiante dans une solution de TBS-Tween 0,1% contenant 0,5 % de régilait. Les membranes ont alors été lavées 3 fois avec une solution de TBS-Tween 0,1% puis placées dans une cassette de révélation et recouvertes chacune par 1 mL de réactif ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences, RPN2132) pendant 5 min puis recouvert en chambre noire d'un film photosensible (GE Healthcare, 28906837). Les films autoradiographiques mis en contact de la membrane ont ensuite été placés dans un bain de révélateur (Sigma, P7042) jusqu'à apparition des signaux, rincés à l'eau distillée puis finalement dans un bain de fixateur (Sigma, P7167).

Anticorps	Références	Dilution	Espèce
anti-GABARAPL1	Chemicon Millipore, AB15278, CHEM-CENT	1/2000 ^e	Lapin
anti-GABARAPL1	ProteinTech Group, 11010-1-AP, PTG-FL	1/1000 ^e	Lapin
anti-GABARAPL1	ProteinTech Group, 11010-1-AP, PTG-NTER	1/1000 ^e	Lapin
anti-Actine	Sigma, 20-33	1/3000 ^e	Lapin
anti-GFP	Chemicon Millipore, AB3080	1/5000 ^e	Lapin
anti-Atg4B	Sigma, A2981	1/1000 ^e	Souris
anti-LC3	Novus Biologicals, NB100-2220	1/2000 ^e	Lapin
anti-CD71	Santa-cruz, sc65882	1/1000 ^e	Souris

Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines.

Résultats/Discussion

I-GABARAPL1 (GEC1) est associée à des vésicules autophagiques

La protéine GABARAPL1 est une protéine homologue de la protéine Atg8 de levure qui appartient à la sous-famille des protéines GABARAP. Elle présente une forte identité de séquence avec ces différentes protéines ainsi que des similarités structurales. Toutes ces protéines possèdent un résidu très conservé : une glycine en position 116 à leur extrémité carboxy-terminale. Dans la littérature, il a été rapporté que ce résidu glycine est essentiel pour leur implication dans le processus d'autophagie.

Ces protéines sont clivées dès leur synthèse par une famille d'endopeptidases appelées Atg4 afin d'éliminer l'acide aminé en dernière position C-terminale et exposer la glycine. Ce clivage donne les formes matures de ces protéines dénommées -I. Cette glycine est ensuite utilisée pour permettre la conjugaison des protéines sur un phospholipide *via* la formation d'une liaison entre le COOH de la glycine et le groupement NH₂ d'une phosphatidylsérine ou phosphatidyléthanolamine. Cette étape de conjugaison donne les formes lipidées de ces protéines appelées -II. Après induction de l'autophagie, les formes clivées des protéines de la sous-famille GABARAP sont conjuguées à un phospholipide grâce à deux enzymes : Atg7 et Atg3. Les formes lipidées des protéines sont alors localisées au niveau de la membrane externe ou interne des autophagosomes et participent à leur élongation.

Au début de ma thèse, en octobre 2008, ce mécanisme de maturation et de lipidation ainsi que l'implication des protéines GABARAP au cours de l'autophagie avait été démontré pour tous les membres de la sous-famille excepté pour GABARAPL1. L'hypothèse selon laquelle GABARAPL1 pouvait également être associée à la formation des autophagosomes a constitué l'objectif initial de mon travail. Les différents résultats obtenus ont montré pour la première fois que :

- GABARAPL1 est clivée dès sa synthèse dans les cellules par la protéine Atg4B pour donner la forme mature cytosolique, GABARAPL1-I ;
- GABARAPL1 est conjuguée à des phospholipides, après induction de l'autophagie ou inhibition de l'activité du lysosome, permettant ainsi l'apparition de la forme lipidée, GABARAPL1-II ;
- La forme GABARAPL1-II est présente dans les fractions membranaires des cellules et absente des fractions cytosoliques ;
- GABARAPL1 est associée à des vésicules intracellulaires et co-localise partiellement avec la protéine GFP-LC3 ;
- GABARAPL1 est localisée partiellement dans les lysosomes ;

- GABARAPL1 est associée à des vésicules d'autophagie puisque cette protéine est relocalisée dans le cytosol des cellules MEF:Atg5^{-/-}, des cellules au sein desquelles le processus d'autophagie est totalement inhibé.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication suivante :

« **GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles** », Chakrama FZ., Seguin-Py S., Legrand JN., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Despouy G., Perez V., Jouvenot M. and Boyer-Guittaut M., *Autophagy*, 2010, **6:4**, 1-11.

GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles

Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Jaclyn Nicole Le Grand, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy, Valérie Perez, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut*

Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie; EA3922 "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central"; IFR133; U.F.R. Sciences et Techniques; Besançon, France

Key words: GEC1, GABARAPL1, GABARAP, LC3, autophagy, lysosome, HEK293, MCF-7

Abbreviations: Atg, autophagy-related genes; DMSO, dimethylsulfoxide; EBSS, earle's balanced salt solution; FBS, foetal bovine serum; GABA_A, γ -aminobutyric acid, type A; GABARAP, GABA_A receptor-associated protein; GABARAPL1, GABARAPL2, GABA_A receptor-protein-like 1 and 2; GATE-16, golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GEC1, glandular epithelial cell protein 1; GFP, green fluorescent protein; HEK293, human embryonic kidney 293; MAP-LC3, microtubule-associated protein light chain 3; MCF-7, michigan cancer foundation-7; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; NH₄Cl, ammonium chloride; PBS, phosphate buffer saline; PFA, paraformaldehyde; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS, sodium dodecylsulfate; SDSLB, SDS loading buffer; SDS-PAGE, SDS polyacrylamide gel electrophoresis; TEMED, N', N', N', N'-tetramethyl ethylenediamine

Gabarapl1 (gce1) was first described as an estrogen-regulated gene which shares a high sequence homology with the *gabarap* gene. We previously demonstrated that GABARAPL1, like GABARAP, interacts with the GABA_A receptor and tubulin and promotes tubulin polymerization. Previous work has demonstrated that the GABARAP family members (GABARAP, LC3, GATE-16 and Atg8) are not only involved in the transport of proteins or vesicles but are also implicated in various mechanisms such as autophagy, cell death, cell proliferation and tumor progression. We therefore asked whether GABARAPL1 might also play a role in autophagy. First, we showed that GABARAPL1 is cleaved at glycine 116, a residue which is conserved in other members of the family. We also demonstrated that GABARAPL1 is linked to phospholipids, delipidated by Atg4B, associated with intracellular membranes and accumulated in intracellular vesicles after inhibition of lysosomal activity. Finally, we showed that GABARAPL1 partially colocalizes with LC3 or LysoTracker green in intracellular vesicles. Taken together, our results demonstrate that GABARAPL1 associates with autophagic vesicles.

Introduction

The search for new estrogen-regulated genes in guinea pig cells performed within our laboratory resulted in the discovery of a new gene called *gce1* (*glandular epithelial cell 1*).¹ Later work showed that this new gene is also expressed in human cells and shares a high homology with a gene named *gabarap* (GABA_A receptor-associated protein).² The two proteins present an almost identical primary sequence (86% identity) and share common features such as their small size (117 amino-acids) and their ability to bind tubulin and GABA_A receptors.^{3,4} Accordingly, GEC1 was classified as a GABARAP-like 1 protein (GABARAPL1) and was described to play a role in intracellular GABA_A receptor trafficking. The GABARAP family is composed of several members which share a high identity and an almost identical three-dimensional structure.⁵ The five identified members of this family are: GABARAP, GABARAPL1, MAP-LC3 (light chain 3 of microtubule associated protein), GATE-16 (Golgi-associated ATPase

enhancer of 16 kDa or GABARAPL2) and the yeast protein Atg8 (Autophagy-related protein 8).

Members of the GABARAP family have been studied mainly for their implication in protein and vesicle intracellular transport due to their reported interaction with the cytoskeleton. It has also been established, however, that GABARAP is involved in cell proliferation, programmed cell death and tumorigenesis⁶⁻⁸ and that Atg8, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3 (LC3) are all involved in the formation and elongation of autophagic vesicles called autophagosomes.⁹

Macroautophagy, hereafter referred to simply as autophagy, is a protein and organelle degradation pathway, first discovered in yeast, allowing the recycling of intracellular molecules during stress conditions such as nutrient or oxygen deprivation.¹⁰ This cellular phenomenon has been described to play a major role during physiological processes such as neurodegenerative diseases, cardiomyopathies, cancer, programmed cell death and bacterial and viral infections.¹¹⁻¹³ During this process, a cup-shaped

*Correspondence to: Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr

Submitted: 09/26/09; Revised: 03/17/10; Accepted: 03/22/10

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/11819

membrane sac (pre-autophagosome) expands to engulf cytosolic components and finally closes to form an autophagosome. The autophagosome then fuses with the lysosome leading to the proteolytic degradation of its content. These two structures are characterized by different molecular markers: Atg5 modification by Atg12 is linked to the formation of pre-autophagosomes and the cleavage and covalent lipidation of LC3 is a marker of autophagosomes.¹⁴

During autophagy, the covalent link between phospholipids and effector proteins occurs through a process similar to that described for Ubiquitin and SUMO-1 (Small Ubiquitin-like Modifier 1).¹⁵ This mechanism and the enzymes involved were first described in yeast but homologous proteins have since been identified in mammals.¹⁶ First, one or several amino acids at the C-terminal end of the precursor protein are cleaved, thanks to a maturation enzyme (Atg4 family), to free a glycine residue (Gly120 in LC3,¹⁷ or Gly116 in GATE-16 and GABARAP¹⁸). This first step leads to the mature form of the protein, denoted by the suffix “-I”. The mature protein is then transferred onto phospholipids via the intervention of an activating enzyme (E1-like, Atg7)¹⁹ and a conjugating enzyme (E2-like, Atg3)²⁰ to yield the phospholipid-linked protein, denoted by the suffix “-II”. This process is cyclic since the effectors can be released thanks to a delipidating enzyme (Atg4 family) which breaks the covalent bond between the protein and the lipid.²¹ Since GABARAP1 shares a high homology with the GABARAP family members and the glycine 116 residue, essential for the autophagic process, is conserved in this protein, we asked whether GABARAP1 might be implicated in the autophagic process as well.

Here we report data demonstrating that GABARAP1 is cleaved at glycine 116 in the cell types tested and is only detectable as the processed mature form of the protein (-I). We also show that GABARAP1 is linked onto phospholipids to generate a modified form of the protein (-II) and demonstrate that it associates with autophagosomes or lysosomes in the cells. Therefore, our work describes, for the first time, the implication of GABARAP1 in autophagy.

Results

GABARAP1 is cleaved in cells at the glycine 116 residue to produce a mature form of the protein. Since it has been previously reported that some effectors of autophagy such as LC3, GATE-16 and GABARAP undergo a necessary maturation step before their involvement in the autophagic process and that GABARAP1 shares a high identity with these proteins, we hypothesized that GABARAP1 may also undergo cleavage to free the glycine 116 (Gly116) and produce the mature form of the protein, GABARAP1-I.

To do so, we designed two different vectors encoding GFP fused to the N-terminus of GABARAP1 (GFP-GABARAP1) or the C-terminus of GABARAP1 (GABARAP1-GFP). When these proteins were expressed in HEK293 cells, we detected the GFP-GABARAP1 protein at the expected size of 44 kDa using either the GFP or GABARAP1 antibody (Fig. 1A, lanes 2 and 6). However when the GABARAP1-GFP protein was expressed

in the cells and the corresponding lysate probed with the anti-GFP antibody, we observed only one signal, corresponding to the truncated GFP protein, below the 29 kDa marker (Fig. 1A, lane 3). The difference in size between the native GFP, 29 kDa in size (lane 1), and the cleaved GFP (lane 3) was due to the presence of a supplementary linker sequence present in the pEGFP-C1 commercial vector. We confirmed these results by probing with the anti-GABARAP1 antibody which produced only one signal at 16 kDa (Fig. 1A, lane 7). These data demonstrate that the GABARAP1-GFP protein is cleaved in the cells into two peptides, GFP and GABARAP1. To investigate whether the glycine 116 was the site of cleavage in GABARAP1, we created a vector encoding the GABARAP1-G116A-GFP protein, a mutant protein in which the Gly116 is replaced by an alanine (Fig. 1B). This mutation has previously been shown to inhibit the cleavage of autophagic effectors of the GABARAP family including GABARAP and LC3.^{17,29} When the GABARAP1-G116A-GFP protein was expressed in HEK293 cells, we detected a signal at the expected size of 44 kDa, corresponding to the fusion protein (Fig. 1A, lanes 4 and 8). These results demonstrate that a single point mutation (G116A) inhibits the cleavage of the GABARAP1 protein in the cells.

GABARAP1 is modified during the autophagic process. Previous work reported that several autophagic effectors (LC3, GABARAP, GATE-16) are linked to phospholipids during the course of autophagy to lead to a modified form of these factors, denoted by the suffix “-II”.¹⁸ This modification status is easily detected by western blotting since the modified phospholipid-linked protein migrates faster than the mature form on SDS-PAGE. To assess if GABARAP1 is linked to phospholipids in the cells and exists as the modified protein GABARAP1-II, we used a HEK293 stable cell line expressing the GABARAP1 protein fused to the Flag epitope at its N-terminus and six histidine residues at its C-terminus, Flag:GABARAP1:6 his.

To enrich and detect the modified form of Flag:GABARAP1:6 his (Flag:GABARAP1-II), we induced and/or blocked the autophagic flux by using different chemical compounds: either inhibitors of lysosomal activity [Bafilomycin A1, a specific inhibitor of the vacuolar type H⁺-ATPase (V-ATPase) or NH₄Cl, a V-ATPase-independent neutralizer of lysosomal pH],³⁰ inhibitors of lysosomal enzyme activity (E64d and PepstatinA, calpain and cathepsins B, D and E inhibitors)²⁶ or inducers of autophagy (Rapamycin, an inhibitor of the mTOR kinase and EBSS, a starvation medium).³¹ By inducing and/or blocking the autophagic pathway, we expected to observe an accumulation of autophagosomes and therefore an increase in the levels of the Flag:GABARAP1-II form of the protein.

When untreated HEK293-Flag:GABARAP1:6his cell lysates were probed with an antibody against GABARAP1, we detected two signals at 16 and 19 kDa (Fig. 2A and B, lanes 1), corresponding to the mature GABARAP-I and GABARAP1-I proteins. This can be explained by the fact that no commercial or homemade antibody which we have tested so far has been able to differentiate between the two homologous proteins.^{3,32} Moreover, previous transient transfection experiments using GABARAP and GABARAP1-expressing vectors showed that

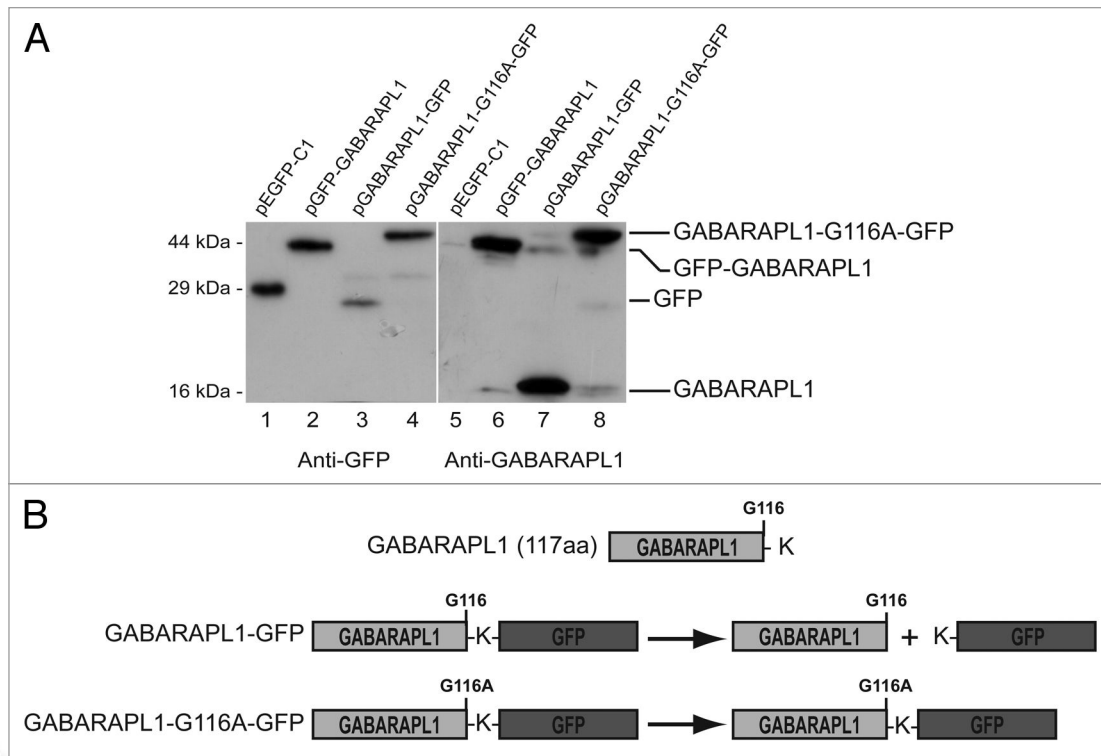


Figure 1. GABARAPL1 is cleaved in cells at the glycine 116 residue to produce a mature form of the protein. (A) HEK293 cells were transfected with the pEGFP-C1, pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP, vectors. After 48 h, cells were lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE and immunoblotted using anti-GFP or anti-GABARAPL1 antibodies and the ECL Plus reagent. Vertical lines have been inserted to indicate repositioned lanes. A representative experiment of 5 performed is shown. (B) Schema representing the GABARAPL1-GFP and GABARAPL1-G116A-GFP fusion proteins and the peptides formed after their expression and maturation in cells.

GABARAP migrates as a 16 kDa protein and GABARAPL1 as a 19 kDa protein on SDS-PAGE (data not shown). GABARAP was therefore used in our assays as an internal control to follow the behavior of a previously described autophagy effector.³³ HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were then cultured in the presence of lysosome or lysosomal enzyme inhibitors (NH_4Cl , Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA),^{27,34} or autophagy inducers (EBSS or Rapamycin) or combinations of both. The GABARAPL1 protein was then detected in the cell lysates by immunoblotting (Fig. 2A and B). In HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells treated with lysosomal activity inhibitors alone (NH_4Cl , Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA), we detected the apparition of two new signals, migrating faster than the unmodified proteins, which corresponded to modified forms of GABARAP (GABARAP-II) and GABARAPL1 (GABARAPL1-II) (Fig. 2A, lanes 2 and 3 and B, lane 2). After treatment of HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells with autophagy inducers (EBSS and Rapamycin), we observed no increase in the amount of the forms -II in the cells (Fig. 2A, lanes 4 and 5 and B, lanes 3 and 4). However, when we incubated the HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells with a combination of autophagy inducers and lysosomal activity inhibitors, we observed a stronger increase in the amount of forms -II of both proteins compared to the inducers or inhibitors alone (Fig. 2A, lanes 6 and 7 and B, lanes 5 and 6). Moreover, we observed that, in our model, the behavior of GABARAPL1 was similar to the previously described behavior of known autophagy

actors such as GABARAP and LC3 (Fig. 2A and B) except that the ratio LC3-II/LC3-I was always higher than the ratio GABARAPL1-II/GABARAPL1-I. All together, these results demonstrate that GABARAPL1 is modified in the cells during the autophagic process and that the amount of the modified form -II is regulated by autophagy inducers and lysosomal degradation inhibitors.

Atg4B delipidates GABARAPL1 in the cells. The cellular autophagic process is a cyclic mechanism and the proteins involved in this pathway are recycled for later rounds. In particular, the proteins linked to the phospholipids which form the autophagosomes can be reused if they are not degraded in the lysosome. To be recycled, these proteins need to be released from the lipids via the intervention of an autophagy-related cysteine protease (Atg4). Several of these enzymes have been described in mammals but one in particular has been described to be involved in the maturation and the recycling of the GABARAP family members: Atg4B.²¹

To assess whether Atg4B was also involved in the recycling of the GABARAPL1 protein and investigate the nature of the modification, we transiently transfected an Atg4B-expressing vector in HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells. Afterwards, we used an anti-GABARAPL1 antibody to detect the GABARAPL1 protein and its modified forms in cell extracts. As shown in Figure 3 (lanes 1, 2 and 3), the cells which did not overexpress the Atg4B protein displayed similar results to the ones previously

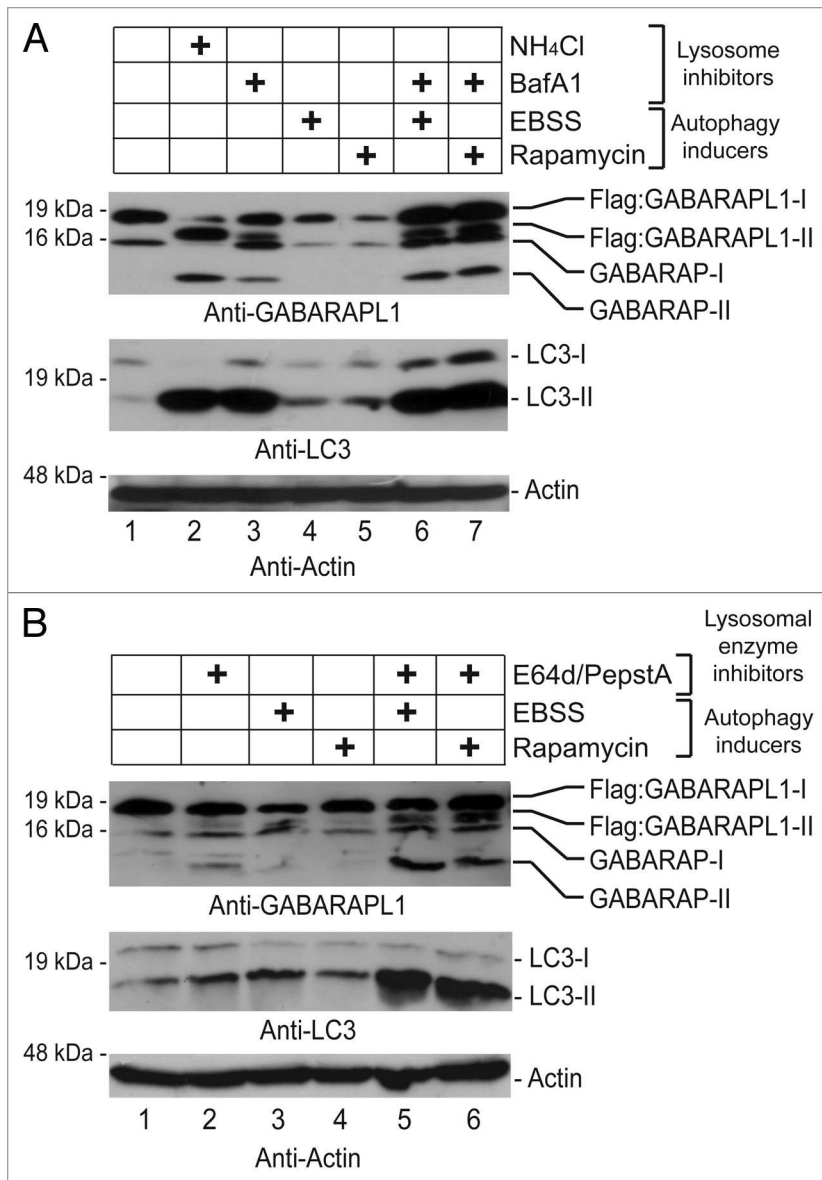


Figure 2. GABARAP1 is conjugated to phospholipids in the cells. HEK293-Flag:GABARAP1:6 his cells were cultured in the presence or absence of autophagy inducers (10 μ M Rapamycin or EBSS for 4 h) with or without (A) a lysosome inhibitor (200 nM Bafilomycin A1 for 16 h) or (B) lysosomal enzyme inhibitors (10 μ g/ml E64d/PepstatinA). Incubation with an inhibitor of lysosomal acidity (50 mM NH₄Cl for 2 h) was used as a positive control in the (A). Cells were then lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAP1, anti-LC3 and anti-Actin antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of five performed is shown.

described in the **Figure 2**. On the contrary, when the Atg4B protein was overexpressed in these cells, we detected an important decrease in the amount of the Flag:GABARAP1-II form of the protein in the cells treated with NH₄Cl and Bafilomycin A1 (**Fig. 3**, lanes 5 and 6) compared to the levels observed in the cells which do not overexpress Atg4B (**Fig. 3**, lanes 2 and 3). We also observed that the levels of GABARAP-II were decreased after Atg4B overexpression. The latter data demonstrate that the autophagy-related cysteine protease Atg4B delipidates the GABARAP1 protein to allow its further recycling and confirm that GABARAP1 is linked onto phospholipids in the cells.

The GABARAP1-II form is associated with membranes in the cells. To determine whether the lipidated form of GABARAP1 (GABARAP1-II) is associated with intracellular membranes, we used a cell fractionation protocol to separate the membrane and soluble fractions of the cells.²⁸ This protocol was applied to HEK293-Flag:GABARAP1:6 his cells grown in complete medium or DMEM supplemented with 1% SVF and NH₄Cl for 2 h. Cell homogenates (Whole Cell Lysates, WCL) were then centrifuged at 100,000 g and the resulting supernatant and pellet were analyzed by immunoblotting using GABARAP1 and Transferrin receptor (CD71) antibodies. The Transferrin receptor was used as a control for cell fractionation as it has been previously described to be associated with the intracellular membrane

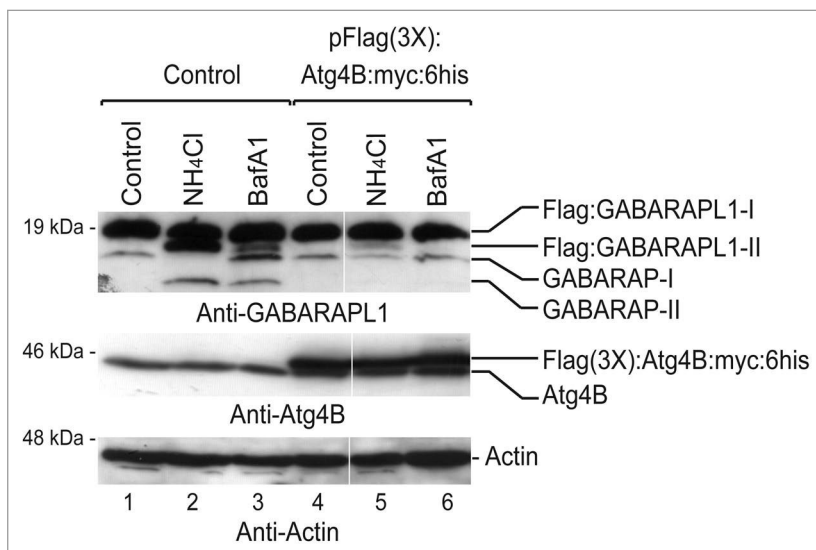


Figure 3. Atg4B delipidates GABARAP1 in the cells. HEK293-Flag:GABARAP1:6 his cells were transfected with a control (pcDNA3.1) or an Atg4B-expressing vector (pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:MyC:6 his). 48 h after transfection, cells were cultured in 50 mM NH₄Cl for 2 h or 500 nM Bafilomycin A1 for 24 h. Cells were then lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAP1, anti-Actin and anti-Atg4B antibodies and detection with the ECL Plus reagent. Vertical lines have been inserted to indicate repositioned lanes. A representative experiment of three performed is shown.

fraction.²⁸ Our results showed that NH_4Cl induced the apparition of the GABARAP-II and GABARAPL1-II forms in the cells (Fig. 4, lane 4, WCL) as described above (Fig. 2). Following cell fractionation, the mature proteins (-I) were predominantly detected in the supernatants of the untreated and treated cells (Fig. 4, lanes 2 and 5). Conversely, the lipidated forms (-II) were enriched in the pellet (membranous fraction) of the induced cells (Fig. 4, lane 6). No form -II was detected in the pellet obtained from the untreated cells (Fig. 4, lane 3). Moreover, the Transferrin receptor was detected predominantly in the pellets demonstrating the specific enrichment of membranes in these fractions. All together, our results show that the GABARAPL1-II form is associated with intracellular membranes in the cells.

Inhibition of lysosomal activity results in the accumulation of GABARAPL1-positive intracytoplasmic vesicles. Thus far, we have shown that GABARAPL1 is modified in the cells, is delipidated by Atg4B, and that the modified form is enriched in intracellular membrane fractions. To confirm that GABARAPL1 is in fact associated with autophagosomes, we investigated the intracellular distribution of this protein after the inhibition of the autophagic flux. Indeed, we already know that proteins linked to autophagic vesicles display a punctate cytoplasmic distribution, corresponding to their localization into autophagosomes.²³ As such, we first designed a MCF-7 stable cell line expressing the DsRed-GABARAPL1 protein, then we inhibited lysosomal activity in these cells. In the untreated DsRed-GABARAPL1 cell lines, the fusion protein was detected in punctate locations throughout the cytosol (Fig. 5A and D). When the MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells were treated with NH_4Cl (Fig. 5B and E), we detected a slight increase in the number of intracellular DsRed-GABARAPL1-positive vesicles. When the DsRed-GABARAPL1 cells were treated with Bafilomycin A1, we detected an increase in the number of GABARAPL1-positive vesicles but more strikingly, we observed a total relocalization of these vesicles in a cluster on one side of the nucleus (Fig. 5C and F). Such a pattern has been previously described for the localization of the lysosomes in the cell.³⁰ In conclusion, GABARAPL1 is localized in intracytoplasmic vesicles, a localization which is increased after treatment with lysosomal activity inhibitors.

GABARAPL1 partially colocalizes with GFP-LC3 or LysoTracker green in intracytoplasmic vesicles. To determine the nature of the DsRed-GABARAPL1-containing vesicles, we used two different approaches: (1) we transiently overexpressed the GFP-LC3 protein in HEK293- and MCF-7-DsRed-GABARAPL1 cells and followed the intracellular localization of the two fusion proteins after treatment of the cells with lysosome inhibitors; (2) we stained the HEK293- and MCF7-Dsred-GABARAPL1 cells with a specific lysosomal marker called LysoTracker green. When we expressed the GFP-LC3 in the DsRed-GABARAPL1-expressing cell lines, we observed a diffuse localization of GFP-LC3 throughout the cytoplasm and the nucleus and some punctate

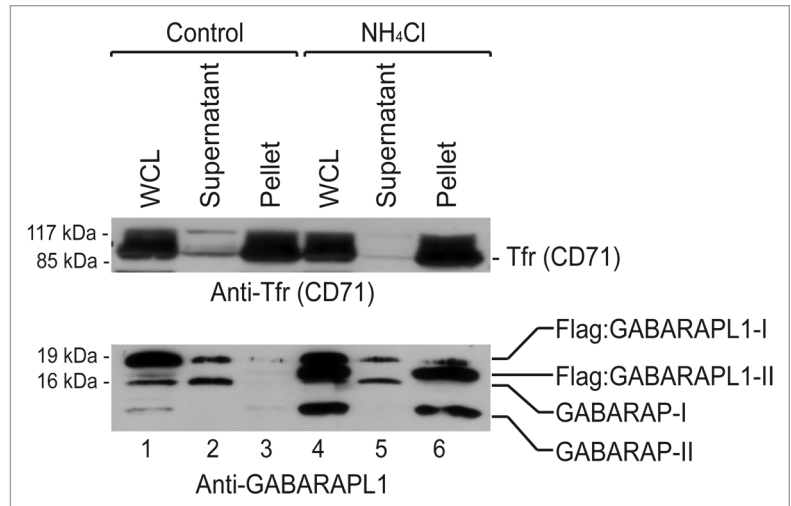


Figure 4. The GABARAPL1-II form is associated with membranes in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in complete medium or DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH_4Cl for 2 h. Cells were then collected in PBS supplemented with 1 mM PMSF, washed, homogenized (WCL, Whole Cell Lysates) and centrifuged for 10 min at 800 g. Following two ultracentrifugation rounds (30 min at 100,000 g), vesicles were resuspended in PBS (Pellet). The supernatant sample corresponds to the supernatant obtained after the first round of ultracentrifugation. One aliquot (20 μl) of each of the different fractions (WCL, supernatant and pellet) was separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAPL1 and anti-Transferrin receptor (Tfr, CD71) antibodies and detection with the ECL Plus reagent. A representative experiment of three performed is shown.

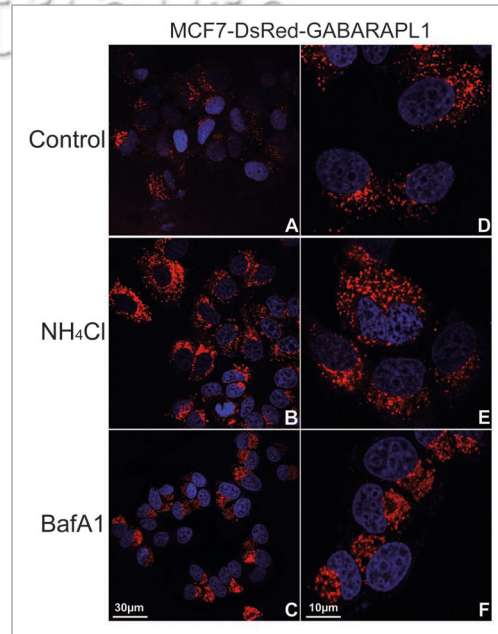


Figure 5. Inhibition of lysosomal activity results in the accumulation of GABARAPL1-positive intracytoplasmic vesicles. MCF-7 cells overexpressing the DsRed-GABARAPL1 protein were incubated in complete medium (Control) (A and D), DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH_4Cl for 2 h (NH_4Cl) (B and E) or complete medium supplemented with 500 nM of Bafilomycin A1 for 24 h (BafA1) (C and F). Cells were then fixed and analyzed by confocal microscopy. The images on the right (D-F) correspond to a 3-fold magnification of the images on the left (A-C). Representative images of three independent experiments are shown.

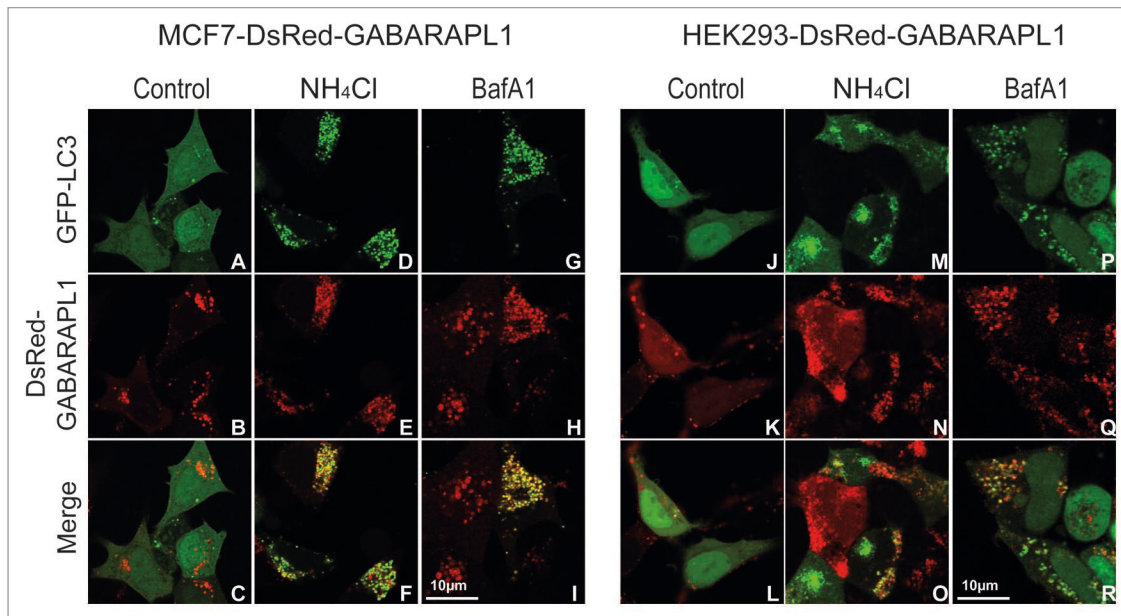


Figure 6. GABARAPL1 partially colocalizes with LC3 in the cells. MCF7- (A–I) or HEK293-DsRed-GABARAPL1 (J–R) cells were transfected with the pGFP-LC3 vector in Lab-Tek™II chambers. 48 h after transfection, cells were incubated with 50 mM NH₄Cl for 2 h (D–F, M–O) or 500 nM Baflomycin A1 for 24 h (G–I, P–R). Living cells were then analyzed by confocal microscopy. Representative images of three independent experiments are shown.

structures in the cytosol. Regarding DsRed-GABARAPL1, the protein was localized in intracytoplasmic dots in MCF-7 and presented a diffuse localization with few punctate structures in

HEK293. When we treated the cells with NH₄Cl or Baflomycin A1 (Fig. 6D, G, M and P), we observed an almost complete relocation of GFP-LC3 into intracytoplasmic vesicles in the two cell lines and an increase in DsRed-GABARAPL1 punctate structures but only part of those GABARAPL1-positive vesicles were LC3-positive as well (F, I, O and R). Since we observed a high heterogeneity of staining between cell lines and between cells from the same culture, we were unable to establish a significant count of the number of vesicles carrying both LC3 and GABARAPL1. Nevertheless, we can affirm that not all vesicles are carrying both proteins. From preliminary counts, we could conclude that approximately 50–70% of vesicles in the MCF-7 cells are double-stained and about 30–50% in the HEK293 cells. Since LC3 has been described to be an autophagosome marker, we concluded that GABARAPL1 was partially located in autophagosomes. Following staining of the HEK293- or MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells with Lysotracker green, we observed that numerous but not all DsRed-GABARAPL1-positive vesicles were stained with Lysotracker green (Fig. 7C and F). All together, these two experiments demonstrate that GABARAPL1 can be localized in LC3-containing or Lysotracker green-stained intracellular vesicles. These results confirm that GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles.

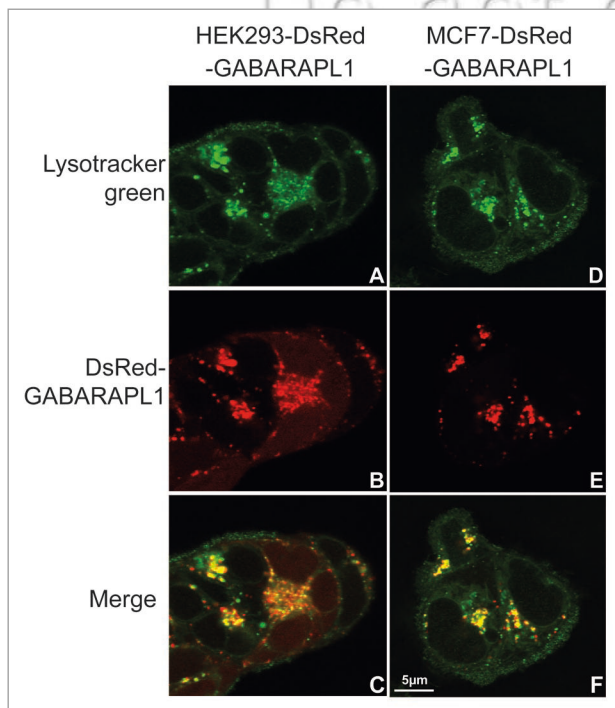


Figure 7. GABARAPL1 is partially localized in lysosomes in the cells. HEK293- (A–C) or MCF7-DsRed-GABARAPL1 (D–F) cells were grown in Lab-Tek™II chambers for 24 h. Cells were then incubated in complete medium supplemented with 50 nM Lysotracker green for 1 h and living cells were analyzed by confocal microscopy. Representative images of three independent experiments are shown.

Intracellular punctate GABARAPL1 staining is abolished in Atg5^{-/-} MEF. Previous publications raised some concern about the tendency of the DsRed protein to form aggregates in the cells, structures which could be mistaken for intracellular vesicles, resulting in misleading conclusions.³⁵ To examine whether the punctate localization of GABARAPL1 in our stable cell lines was the result of DsRed aggregates or not, we transiently transfected WT and Atg5^{-/-} MEF cells with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector and followed the localization

of the fusion protein before and after inhibition of lysosomal activity by NH_4Cl or Bafilomycin A1 (Fig. 8). Former publications showed that the deletion of Atg5 abrogated the autophagic pathway in MEF cells.²⁴ Our results demonstrated that, before treatment, the WT cells presented a high number of red vesicles whereas the Atg5^{-/-} cells contained a very low number of these DsRed-GABARAPL1-stained vesicles. After incubation with lysosomal inhibitors, we detected an increase in the number of punctate structures in the WT cells (Fig. 8A–C), and a significantly smaller increase in the Atg5^{-/-} cell line (Fig. 8D–F). Taken together, our results demonstrate that the deletion of Atg5, and therefore the inhibition of the autophagic process, alters the formation of DsRed-GABARAPL1-stained vesicles showing that these structures are not protein aggregates but rather related to the process of autophagy.

Discussion

Previous work has described the involvement of different GABARAP family members in the autophagic process. Atg8, LC3, GABARAP and GATE-16 have all been shown to be linked to phospholipids and recruited to autophagosomes after induction of autophagy.²³ These effectors play an important role during the elongation of double-membraned structures leading to the sequestration of cytosolic constituents and to the formation of autophagosomes. After their completion, these vesicles fuse with lysosomes to induce the degradation and recycling of their contents.¹⁸ To our knowledge, all the data published to date show that these proteins play a role as effectors of autophagy but not as activators. Since GABARAPL1 (GEC1) shares a high identity with GABARAP as well as other members of the family, we asked whether GABARAPL1 might be implicated in this process as well. To examine this possibility, we addressed different questions: (1) Is GABARAPL1 cleaved in the cells to free the glycine 116 residue at its C-terminal end?, (2) Is GABARAPL1 linked to phospholipids in the cells?, (3) Is GABARAPL1 delipidated by the autophagy-related cysteine protease Atg4B?, (4) Is GABARAPL1 associated with intracellular vesicles?, (5) Does GABARAPL1 relocalize to autophagosomes during the autophagic process?

First, we showed that a GABARAPL1-GFP fusion protein was cleaved to give two products, GABARAPL1 and GFP but that this cleavage was abolished when the glycine 116 residue was replaced by an alanine. These results demonstrate that GABARAPL1 is processed in the cells and that the maturation occurs at glycine 116. Moreover, it is worth noting that we were unable to detect the GABARAPL1-GFP fusion protein in our cell lysates, suggesting that this protein was cleaved following its synthesis and that this maturation step was not a consequence of autophagy induction. In addition, similar data were obtained using GABARAP wild-type and mutant-expressing vectors in HEK293 (data not shown) and these results were confirmed, for the two proteins (GABARAPL1 and GABARAP), in different cell types (COS7, MCF-7) showing that this process is not cell-type specific (data not shown).

We then asked whether GABARAPL1 was modified in the cells. To do so, we used a combination of different chemicals inducing

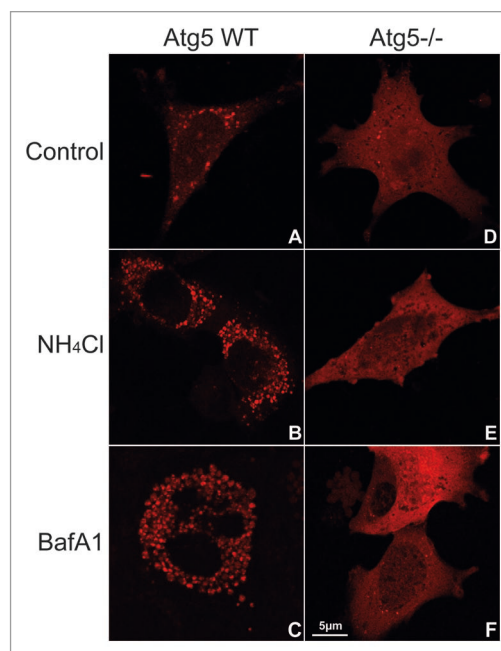


Figure 8. Intracellular punctate GABARAPL1 staining is abolished in Atg5^{-/-} MEFs. WT (A–C) and Atg5^{-/-} (D–F) MEF cells were transfected with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector. 48 h after transfection, cells were incubated in complete medium (A and D), with 50 mM NH_4Cl for 2 h (B and E) or 500 nM Bafilomycin A1 for 24 h (C and F). Cells were then analyzed by confocal microscopy. Representative images of three independent experiments are shown.

the autophagic process or inhibiting the lysosomal degradation. We incubated HEK293 cells overexpressing the GABARAPL1 protein with: (1) lysosome inhibitors (NH_4Cl , Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA), (2) autophagy inducers (rapamycin or EBSS), or (3) a combination of both. Subsequently, we searched for the modified form of the protein (GABARAPL1-II) in these cells. All of these treatments have been previously described to result in a significant increase in the amount of the phospholipid-linked forms of autophagy effectors such as LC3 and GABARAP. In our experiments, we effectively detected GABARAPL1-II but we observed variations in the amount of this form according to the protocol used. The highest levels were detected with NH_4Cl . EBSS and rapamycin did not allow the detection of the form -II without the addition of lysosomal degradation inhibitors (Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA). It is noteworthy that we obtained the same results with the stable MCF7-Flag:GABARAPL1:6 his cell line (data not shown). In conclusion, we show that GABARAPL1 is modified in the cells and that this modification is induced by autophagy inducers. These results are in agreement with the data obtained for the other members of the GABARAP family including GABARAP, LC3 and GATE-16.³⁶ The fact that this modification is only detected when the degradation of the forms -II are inhibited by lysosomal activity inhibitors is congruent with previously published data on LC3.²⁶ Moreover, we clearly see in our experiment that the lipidation of LC3 is weak in the presence of the autophagy inducers alone compared to the levels detected after addition of lysosome inhibitors. Therefore, it seems that, in

our model, the conjugation of autophagy effectors to phospholipids is a slower process than that of degradation.

We also observed that the levels of lipidation of the individual Atg8 family members examined are different, with LC3 presenting a higher rate of modification than the two other proteins, GABARAP and GABARAPL1. These results were similar to those obtained in the MCF-7 cell line (data not shown). Nevertheless, since the affinity of the antibodies we used may vary from one form (-I) to another (-II), we cannot quantify the respective amounts of the -I and -II forms in the cells. Indeed, Mizushima and Yoshimori previously demonstrated that a specific LC3 antibody did not recognize the phospholipid-modified protein with the same affinity than the native one.³⁷ They argued that a comparison of the ratio of conversion -I/-II between proteins, conditions or cell types would be misleading.

We know that *gabarapl1* transcripts are highly expressed in the brain and are more abundant than the *lc3* ones.³⁸ It has also previously been published that *gabarapl1*, *lc3* and *atg12* transcript expression is enhanced under cellular stress such as glucose deprivation by the FoxO transcription factors in cultured rat neonatal cardiomyocytes.³⁹ Moreover, these increases of expression correlate with an activation of the autophagic flux but the relative involvement of GABARAPL1 and LC3 in this process still has to be determined. In addition, the authors of the latter article did not demonstrate that the antibody used to detect GABARAPL1 was specific to this protein and that the signals obtained were not linked to the expression of its homologue GABARAP. At the moment, with the tools available, it is therefore impossible to determine the relative role of each of the Atg8 family members during the course of autophagy, since they are all involved in the same step of this process. One solution might be to create knockout cell lines for each of these factors and study the behavior of the mutant cells throughout the course of autophagy, particularly during the formation of autophagosomes. In conclusion, the tissue- or cell-specific expression of GABARAPL1 has still to be determined in order to study its relative involvement in autophagy as well as a comparison to the expression of the autophagic marker, LC3. These studies will, however, require a specific antibody. Nevertheless, we believe that the role of GABARAPL1 in autophagy is subtle and probably linked to a specific tissue such as the brain, where it is highly expressed, or to a specific autophagic process such as mitophagy.⁴⁰

We then wondered whether the lipidation of GABARAPL1 in the cells was a reversible mechanism, as it has already been described for LC3, GABARAP and GATE-16.¹⁸ To assess this question, we expressed the maturation/delipidating Atg4B enzyme in HEK293 cells overexpressing GABARAPL1 then blocked autophagosomal degradation to look for the phospholipid-linked form of GABARAPL1. Similar to the data obtained for GABARAP family members,⁴¹ we observed a significant decrease of GABARAPL1-II in the cells expressing Atg4B compared to the levels present in the untransfected cells. These results demonstrate that Atg4B is able to delipidate GABARAPL1. The latter data obtained in the cellular context are congruent with those previously described *in vitro*.⁴² In the latter publication, the authors also showed that an overexpression of Atg4B reduced

the number of intracellular GFP-GABARAPL1-positive vesicles and that a siRNA directed against Atg4B slightly diminished GABARAPL1 delipidation in the cells. However, in their experiments, the authors used a polyclonal antibody raised against the full length protein GABARAPL1 but never demonstrated the specificity of this antibody by showing that it did not recognize GABARAP. The question of the specificity of this anti-GABARAPL1 antibody would have to be addressed to draw any concrete conclusions about the identity of the protein detected in their immunofluorescence experiments.

To complement the previous results, we performed cell fractionation experiments to determine whether GABARAPL1-II is associated with intracellular membranes after inhibition of the autophagic flow. Our data presented in **Figure 4** displayed that the form -II of both GABARAP and GABARAPL1 were highly enriched in the membrane fraction compared to the levels detected in the soluble fraction. It is worth noting that these results are similar to the ones previously published for LC3.⁴³ Nevertheless, it will be necessary in the future to develop a more accurate purification protocol to separate vesicles tagged with different proteins in order to determine if the two proteins can be co-purified in the same membrane fractions or if they are present in a different set of vesicles.

We additionally investigated whether the modification of GABARAPL1 in the cells was linked to a relocalization of the protein to intracellular vesicles after autophagy blockage. To address this question, we used two different stable cell lines, HEK293 and MCF-7 overexpressing the DsRed-GABARAPL1 protein. Using these cell lines, we observed that the untreated cells presented a GABARAPL1 punctate staining and that this vesicular localization was enhanced after treatment with lysosome inhibitors demonstrating that GABARAPL1 accumulates in intracellular puncta after lysosomal inhibition. It is noteworthy that the organization of these dots was different according to the chemicals used. With NH_4Cl , the puncta were localized throughout the cytoplasm whereas with Bafilomycin A1 they were concentrated in a cluster on one side of the nucleus. Such a staining pattern has already been described for lysosomes.³⁰ Further experiments will be needed to determine if the puncta accumulating with the two chemicals represent identical vesicle population or if they differ. Former publications describe that NH_4Cl action is linked to lysosomal activity whereas Bafilomycin A1 inhibits autophagosome/lysosome fusion.³⁰ These chemicals do not, therefore, target the same step in the autophagic pathway which might explain the difference in GABARAPL1 staining in the cells.

Consequently, we asked whether GABARAPL1 colocalizes with an autophagosome marker or is localized in acidic vesicles in the cells. For this purpose, we transfected HEK293- and MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells with a GFP-LC3-expressing vector and visualized the localization of the two proteins after lysosome inactivation. The data obtained showed that a majority of vesicles, but not all, were double-stained for GABARAPL1 and LC3. The fact that these two proteins do not always colocalize can be explained in four ways: (1) a difference of expression of the two proteins in the cells, (2) the difference in stability between the GFP and DsRed fluorescence in acidic vesicles,³⁵ (3) the fact that

all autophagosomes might not be carrying both proteins, or (4) that GABARAPL1 may also be associated with a different set of vesicles not involved in the autophagic pathway. To answer this question, we stained HEK293- and MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells with a specific lysosomal marker, LysoTracker green. In this experiment, we did not use lysosomal inhibitors since LysoTracker green chemical is sensitive to pH changes. This double-staining experiment showed that the majority of GABARAPL1 colocalizes with the lysosomes but that GABARAPL1 can be also found outside of the lysosomes. All together, the latter data demonstrate that GABARAPL1 is predominantly localized in autophagosomes or lysosomes. These results are not surprising since autophagosomes fuse with lysosomes to form autophagolysosomes and induce the degradation of their contents. Since GFP fluorescence is rapidly inhibited in acidic compartments, GFP-LC3 might allow the detection of early nonacidic autophagosomes whereas LysoTracker green stains late acidic vesicles.

These data are really interesting and will lead to some follow-up experiments. Indeed, a recent publication described the interaction of LC3/GABARAP family members with the protein Nix involved in the clearance of damaged mitochondria by the autophagic pathway.⁴⁰ The authors showed that GABARAPL1 binds more strongly than other members of the family to Nix and that GABARAPL1 colocalizes with Nix in cells treated with a mitochondria poison. These results suggest that the clearance of damaged mitochondria may be mediated by the specific association between GABARAPL1 and Nix and therefore confer a specificity to the nonspecific autophagic process. In the near future, it will be of interest to determine whether the autophagic proteins of the LC3/GABARAP family have specific and different cellular patterns, are linked to specific autophagic vesicles or if these proteins are involved in distinct autophagic degradation processes in the cells.

One main concern regarding the use of overexpression systems or exogenous protein expression is the fact that some proteins can aggregate and therefore create intracellular punctate structures which might be mistaken for vesicles. To demonstrate that the GABARAPL1-containing dots observed in our experiments were autophagy-related, we used the MEF Atg5^{-/-} cell line defective for the autophagic pathway.²⁴ When we expressed the DsRed-Protein in this cell line, we observed a very low number of intracellular red vesicles before or after treatment with NH₄Cl or Bafilomycin A1 compared to the wild-type control cells. These results confirmed that the vesicles we observed are autophagy-related or at least that their formation requires Atg5. The low number of vesicles still detectable in the Atg5^{-/-} cells might be due to the role of GABARAPL1 as a transport protein³⁸ but we also cannot completely rule out the idea that some aggregates are formed when using the DsRed protein as previously described.³⁵ Further experiments will be needed to assess this question.

In our study, we used transient transfection assays or designed stable cell lines overexpressing fusion proteins because we did not possess a specific anti-GABARAPL1 antibody. Indeed, all the homemade or commercial antibodies we have tested to date are not specific for GABARAPL1, as they detect the GABARAP protein as well.^{3,32} This is not surprising since the two proteins share

86% identity at the amino-acid level. Recently published papers have used polyclonal anti-GABARAPL1 antibodies to detect the protein in immunofluorescence experiments. However, the question of specificity of these antibodies was not addressed and therefore the identity of the protein studied in these publications remains unclear.^{39,42} Consequently, apart from western blotting experiments in which we were able to differentiate between the two homologous proteins, we opted out of using our anti-GABARAPL1 antibody for immunofluorescence experiments. The production of a specific antibody directed against the GABARAPL1 protein will be one of the next challenges before extending the study of this protein.

Using different experimental assays, we demonstrated in a multitude of ways that GABARAPL1 is implicated in the process of autophagy. Nevertheless, further experiments will be needed to explain the link between autophagy, GABARAPL1 and its function in vivo. In particular, it would be of great interest to study the relative involvement of the different members of the GABARAP family in the autophagic process. Are these proteins redundant in the cells or are they tissue specific? We know that numerous tissues co-express the GABARAP and GABARAPL1 proteins but also that some tissues express one protein rather than the other.^{32,38} For example, *gabarapl1* transcripts are much more abundant in the brain compared to *lc3* and *gabarap*.³⁸ Given the importance of autophagy in brain damage⁴⁴ and neurodegenerative diseases,⁴⁵ it will be essential to study the function of GABARAPL1 in the brain with respect to its implication in autophagy.

Materials and Methods

Reagents and antibodies. Cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore, AB15278), polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals, NB100-2220), polyclonal anti-GFP (Chemicon Millipore, AB3080), polyclonal anti-Transferrin receptor (CD71) (Santa Cruz, sc65882), monoclonal anti-Atg4B (Sigma, A2981) and polyclonal anti-Actin (Sigma, A5060). Bafilomycin A1 (Sigma, B1793) was prepared as a 1 mM stock in DMSO. Ammonium chloride (NH₄Cl, Sigma, A0171) was prepared as a 0.5 M stock in H₂O. Rapamycin (Sigma, R8781) was prepared as a 2.5 mM stock in DMSO. E64d and Pepstatin A (Sigma, E8640 and P5318) were prepared as 10 mg/ml stocks in DMSO. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Plasmids and site-directed mutagenesis. The pcDNA3.1 vector (Invitrogen, V795-20) was used for control transfections. The pcDNA5-FRT vector was purchased from Invitrogen (V6010-20). The pEGFP-C1 and pEGFP-N3 plasmids were obtained from Clontech (6084-1 and 6080-1). The pGFP-LC3, and pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6 his plasmids were kindly provided by Dr. Elazar (Weizmann Institute, Israël),²² and Dr. Yoshimori (Osaka University, Japan),²³ respectively. The pGABARAPL1-GFP and pGFP-GABARAPL1 plasmids encoding the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) fused to the N-terminus or C-terminus of the GABARAPL1 protein were

generated by polymerase chain reaction (PCR). The reactions were performed in a 25 μ l sample volume containing 0.2 μ M of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs and 1 U of Taq polymerase (Promega, M8305). The PCR fragments were digested with the *XhoI/SacII* or *BglIII/EcoRI* restriction enzymes (Fermentas, ER0691, ER0201, ER0281 and ER0271) and sub-cloned into the pEGFP-N3 or the pEGFP-C1 vectors to produce the pGABARAPL1-GFP and the pGFP-GABARAPL1 plasmids, respectively. The point mutation (G116A) was introduced using the QuickChange Site-Directed mutagenesis system (Stratagene, 600385) to produce the pGABARAPL1-G116A-GFP vector. The Flag:GABARAPL1:6 his cDNA was digested with the *NheI/NotI* restriction enzymes (Fermentas, ER0971 and ER0591) and sub-cloned into the pcDNA5-FRT vector (Invitrogen) to produce the pcDNA5-Flag:GABARAPL1:6 his vector. Plasmid sequences and mutations were confirmed by DNA sequencing (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems). The nucleotide sequences of the different primers are available upon request.

Cell culture and transfection. The HEK293 and MCF-7 cells (ATCC, CRL-1573 and HTB-22), WT and Atg5^{-/-} MEF cells (kindly provided by Dr. Mizushima)²⁴ were cultured in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, Invitrogen, 11880) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030-032), 100 μ g/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, 15140) and 10% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, 10270-106) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. The HEK293- and MCF7-Flag:GABARAPL1:6 his cell lines were maintained in the complete medium supplemented with 100 μ g/ml Hygromycin B (PAA, P02-015). The HEK293- and MCF7-DsRed-GABARAPL1 cell lines were maintained in the complete medium supplemented with 100 μ g/ml G418 (PAA, P02-012). Transient transfections were carried out using HEK293, MCF-7, WT and Atg5^{-/-} MEF cells plated in 6-well plates (3 x 10⁵ per well). 500 ng of pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP, pGFP-LC3 or pDsRed-GABARAPL1 and 1 μ l TransFast reagent (Promega, E2431) were used per reaction according to the manufacturer's protocol. To create the stable cell lines HEK293- or MCF7-Flag:GABARAPL1:6 his, HEK293 or MCF-7 cells were plated in 10 cm-diameter culture dishes (10⁶ per plate) and were transfected using 20 μ g pcDNA5-Flag:GABARAPL1:6 his and 40 μ l TransFast reagent per reaction, according to the manufacturer's protocol. After 48 h incubation, cells were split in two culture dishes and 400 μ g/ml Hygromycin B were added to the complete medium for the 14 following days until the appearance of antibiotic-resistant single clones. The clones were then tested for the expression of the ectopic protein by western blotting using a polyclonal anti-GABARAPL1 antibody. To create the stable HEK293- or MCF7-DsRed-GABARAPL1 cell lines, HEK293 or MCF-7 cells were transfected using 20 μ g pDsRed-GABARAPL1 and 40 μ l TransFast reagent per reaction, according to the manufacturer's protocol. 400 μ g/ml G418 were added to the complete medium to select for single clones.

Autophagy and confocal microscopy. For the inhibition of lysosomal activity, cells cultured on glass coverslips were incubated for either 2 h in DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM

ammonium chloride,²⁵ 4 h in complete medium supplemented with 10 μ g/ml E64d/PepstatinA²⁶ or 24 h in complete medium supplemented with 500 nM Bafilomycin A1.²⁷ For the induction of autophagy, cells were incubated for either 4 h in EBSS medium (Sigma, E3024) or 4 h in complete medium supplemented with 10 μ M Rapamycin. Treated or untreated DsRed- or GFP-expressing cells were then fixed with 2% paraformaldehyde (PFA, Sigma, P6148) in PBS for 15 min, washed thrice with PBS and analyzed using a fluorescence laser scanning confocal microscope Fluoview FV1000 (Olympus). Each picture corresponds to one example of a typical cell staining observed in six fields chosen at random. For the LysoTracker green staining, cells were grown in Lab-Tek™II chambers (Nunc, 155380) for 24 h and subsequently incubated in complete medium supplemented with 50 nM LysoTracker green (Invitrogen, L7526) for 1 h. Living cells were then analyzed by confocal microscopy as described above.

Cell fractionation. Cell fractionation was carried out essentially as described previously.²⁸ In brief, HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in complete medium or DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH₄Cl for 2 h to inhibit lysosomal activity. Cells were washed, collected in 1 ml PBS containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, 93482), homogenized by sonication (Sonic and Materials) and the large vesicles and nuclei were pelleted at 800 g for 10 min. Supernatants were centrifuged at 100,000 g for 30 min to harvest the membranes and intracellular vesicles and organelles. The pellets were resuspended in homogenization buffer, sonicated once more and subjected to a second round of ultracentrifugation. Pellets were then resuspended in 1 ml PBS and one aliquot (20 μ l) of the different fractions (Whole Cell Lysate, Supernatant of the first centrifugation and Pellet) were reserved for western blot analysis.

Western blot analysis. Cells were rinsed with ice-cold PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) and lysed in a SDS-PAGE loading buffer (78 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 12.5%, 6.25% β -mercaptoethanol, 0.025% bromophenol blue). Samples were sonicated for 30 s before loading (Sonic and Materials) and separated by SDS-PAGE before transfer to Immobilon-P PVDF membrane (Dutscher, 44088). The membranes were blocked with 5% skim milk in 0.1% Tween 20/TBS (199 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.36 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with primary antibodies in antibody block buffer (0.5% skim milk in 0.1% Tween 20/TBS). The polyclonal anti-GFP, anti-GABARAPL1, anti-LC3, anti-Actin and anti-Transferrin receptor (CD71) antibodies were diluted at 1:5,000, 1:2,000, 1:2,000, 1:2,000 and 1:1,000, respectively in the antibody block buffer. Immunoreactive bands were detected using goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (1:20,000 in antibody block buffer) (PARIS, P1291) and the ECL Plus reagent (GE Healthcare Life Sciences, RPN2132), according to the manufacturer's protocol.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer, Comité du Doubs. Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn

Nicole Le Grand are supported by fellowships from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and Stéphanie Seguin is supported by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. We thank Dr. Elazar, and Dr. Yoshimori for kindly providing the pGFP-LC3, and the

pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6 his vectors, respectively. We thank Dr. Mizushima for kindly providing the WT and Atg5^{-/-} MEF cells. Authors are grateful to Sophie Launay and Fabrice Poncet for their technical help (Plateformes microscopie et séquençage, IFR133, Besançon). Special thanks to Dr. Petra Gross for editorial advice.

References

- Pellerin S, Lafeuillade B, Wade RH, Savona C, Chambaz EM, Feige JJ. The molecular structure of corticotropin-induced secreted protein, a novel member of the thrombospondin family. *J Biol Chem* 1993; 268:18810-7.
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, et al. A novel early estrogen-regulated gene *gcl1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25.
- Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 1999; 397:69-72.
- Mohrluder J, Schwarten M, Willbold D. Structure and potential function of gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein. *FEBS J* 2009; 276:4989-5005.
- Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Schernbeck S, Petersen I. Characterization of [gamma]-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:394-400.
- Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 2007; 14:693-702.
- Schwarten M, Mohrluder J, Ma P, Stoldt M, Thielmann Y, Stangler T, et al. Nix directly binds to GABARAP: a possible cross-talk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2009; 5:690-8.
- Longatti A, Tooze SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* 2009; 16:956-65.
- Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335:1-32.
- Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol Oncol* 2009; 3:366-75.
- Rami A. Review: Autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35:449-61.
- Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* 2009; 16:57-69.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 1998; 395:395-8.
- Denuc A, Marfany G. SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem Soc Trans* 38:34-9.
- Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 2002; 1:11-21.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* 2004; 279:47704-10.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2503-18.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3. *J Biol Chem* 2001; 276:1701-6.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* 2002; 277:13739-44.
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP and Apg8L. *J Biol Chem* 2003; 278:51841-50.
- Shvets E, Elazar Z. Autophagy-independent incorporation of GFP-LC3 into protein aggregates is dependent on its interaction with p62/SQSTM1. *Autophagy* 2008; 4:1054-6.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004; 117:2805-12.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432:1032-6.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 2007; 3:181-206.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 2005; 1:84-91.
- Marazziti D, Di Pietro C, Golini E, Mandillo S, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP. Macroautophagy of the GPR37 orphan receptor and Parkinson disease-associated neurodegeneration. *Autophagy* 2009; 5:741-2.
- Yoshimori T, Yamagata F, Yamamoto A, Mizushima N, Kabeya Y, Nara A, et al. The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11:747-63.
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA, Olsen RW. C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* 2007; 27:6655-63.
- Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, Klionsky DJ. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 2009; 5:585-9.
- Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2491-502.
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, Jouvenot M. Specific regional distribution of *gcl1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15.
- Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP and GATE-16. *J Biol Chem* 2006; 281:3017-24.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4:151-75.
- Katayama H, Yamamoto A, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A. GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell Struct Funct* 2008; 33:1-12.
- Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:637-44.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3:542-5.
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of *gabarap*, *gcl1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1074:83-7.
- Sengupta A, Molkenin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284:28319-31.
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 11:45-51.
- Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABA_A receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* 2004; 279:36268-76.
- Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 2009; 122:2554-66.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.
- Zheng YQ, Liu JX, Li XZ, Xu L, Xu YG. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30:919-27.
- Lee JA. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. *BMB Rep* 2009; 42:324-30.

II-Expression de la protéine GABARAPL1 dans des lignées cellulaires et dans des conditions pathologiques

1)-Recherche d'un anticorps spécifique de la protéine GABARAPL1

La forte identité de séquence de la protéine GABARAPL1 avec son homologue GABARAP rend la détection de ces protéines très difficile. Actuellement, l'étude de la protéine GABARAPL1 repose essentiellement sur des modèles cellulaires de surexpression de la protéine fusionnée à un ou plusieurs épitopes. En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les épitopes auxquels GABARAPL1 est fusionnée permet de détecter la protéine et ainsi d'étudier son expression et sa localisation. Cependant, l'étude des protéines GABARAP et GABARAPL1 endogènes dans les cellules ou tissus est actuellement très difficile à entreprendre à cause des anticorps qui présentent des réactions croisées avec les deux protéines. Ainsi, il est conseillé de tester la spécificité des anticorps vis à vis des deux protéines avant leur utilisation. Il est à noter que la détection par western-blotting des deux protéines est possible, même avec des anticorps non spécifiques, du fait de leur migration différente sur gel SDS-PAGE 15 %. En effet, GABARAPL1 migre à 17 kDa alors que GABARAP présente une migration plus rapide.

Pour résoudre ce problème, nous avons alors décidé de comparer la spécificité *in vitro* et *in vivo* de trois anticorps commerciaux dirigés contre la protéine GABARAPL1 afin de déterminer le meilleur outil pour étudier cette protéine.

Les résultats de ces travaux ont montré que les conclusions peuvent être erronées du fait de la faible spécificité des anticorps utilisés. Néanmoins, nous avons pu sélectionner un anticorps polyclonal de lapin (11010-1-AP, ProteinTech) qui semble être spécifique en western-blotting et également *in vivo*. Nous n'avons pas testé tous les anticorps disponibles sur le marché mais les entreprises que nous avons contactées n'ont pas pu assurer de leur spécificité et ne l'ont d'ailleurs jamais testée.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication suivante :

« **GABARAPL1 antibodies: target one protein, get one free!** », Jaclyn Nicole Le Grand, Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot, Pierre-Yves Risold and Michaël Boyer-Guittaut., *Autophagy*, 2011, **7:11**, 1-6.

GABARAPL1 (GEC1) antibodies

Target one protein, get one free!

Jaclyn Nicole Le Grand, Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot, Pierre-Yves Risold and Michaël Boyer-Guittaut*

Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie ; EA3922; "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central"; IFR133 ; U.F.R. Sciences et Techniques; Besançon, France

Key words: GABARAPL1, GEC1, GABARAP, LC3, autophagy, antibody

Atg8 is a yeast protein involved in the autophagic process and in particular in the elongation of autophagosomes. In mammals, several orthologs have been identified and are classed into two subfamilies: the LC3 subfamily and the GABARAP subfamily, referred to simply as the LC3 or GABARAP families. GABARAPL1 (GABARAP-like protein 1), one of the proteins belonging to the GABARAP (GABA_A receptor-associated protein) family, is highly expressed in the central nervous system and implicated in processes such as receptor and vesicle transport as well as autophagy. The proteins that make up the GABARAP family demonstrate conservation of their amino acid sequences and protein structures. In humans, GABARAPL1 shares 86% identity with GABARAP and 61% with GABARAPL2 (GATE-16). The identification of the individual proteins is thus very limited when working in vivo due to a lack of unique peptide sequences from which specific antibodies can be developed. Actually, and to our knowledge, there are no available antibodies on the market that are entirely specific to GABARAPL1 and the same may be true of the anti-GABARAP antibodies. In this study, we sought to examine the specificity of three antibodies targeted against different peptide sequences within GABARAPL1: CHEM-CENT (an antibody raised against a short peptide sequence within the center of the protein), PTG-NTER (an antibody raised against the N-terminus of the protein) and PTG-FL (an antibody raised against the full-length protein). The results described in this article demonstrate the importance of testing antibody specificity under the conditions for which it will be used experimentally, a caution that should be taken when studying the expression of the GABARAP family proteins.

Introduction

Gabarapl1/gec1 (*gabapap-like 1 protein/glandular epithelial cell 1*) is an estrogen-regulated gene that belongs to the *gabapap* (GABA_A receptor-associated protein) family of genes. It has been demonstrated that GABARAPL1 acts in receptor and vesicle transport thanks to its interaction with tubulin and the GABA_A and kappa-opioid receptors.^{1,2} GABARAPL1 also plays a role, like GABARAP, GATE-16 and LC3, in the process of autophagy and can be now considered as an autophagic marker as well.³ The exact role of GABARAPL1 in intracellular transport and autophagy, however, is still unanswered, and will require further studies to address the remaining uncertainties. As with any experiment, the proper tools are critical to its success. As such, one essential technical question will have to be answered before the in vivo role of GABARAPL1, and similarly, the role of its closest homolog, GABARAP, can be elucidated: the question of the specificity of the currently available polyclonal anti-GABARAPL1 and anti-GABARAP antibodies. Indeed, we know that these two proteins share 86% identity at the amino-acid level (Fig. 1) and that the crystal structures of these proteins present identical tri-dimensional structures, similar to that of the ubiquitin protein.⁴⁻⁶ These shared features make it very difficult to produce a

specific antibody directed against only one of these two proteins. Moreover, in humans, GABARAPL1 shows 61% identity with GATE-16,⁷ 54% with yeast Atg8 (autophagy-related protein),⁸ and 28.8% with MAP-LC3 (light chain 3 of microtubule associated protein).⁹⁻¹¹

GABARAPL1 was first discovered in 1993 and described as part of the GABARAP family in 2001.¹² When performing a far from exhaustive search on PubMed, we counted about 31 publications citing this protein (using three different names: GEC1, GABARAPL1 or GABARAP-L1). Within these 31 publications, only nine presented antibody-detection of the GABARAPL1 protein. The majority of these publications examine the expression of *gabapap1* at the mRNA level.

Since the discovery of GABARAPL1 in our laboratory, we have endeavored to identify reliable tools to study this protein and have developed an appreciation for the technical problems linked to these tools. The main problem is that GABARAP and GABARAPL1 are so closely related (86% identity, Fig. 1) that their in vivo immunodistinction becomes very improbable. This problem can be easily circumvented when working with immunoblotting analysis. Although their calculated molecular weights are identical (14 kDa), GABARAPL1 displays a slower migration rate than GABARAP, allowing one to separate the two proteins with a

*Correspondence to: Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr
Submitted: 05/18/11; Revised: 07/18/11; Accepted: 07/20/11
<http://dx.doi.org/>

GABARAPL1	MKFQYKEDHPFEYRKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARVPDLDKRKYLVPSDLTVGQF	-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRSSEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARIGDLDKKKYLVPSDLTVGQF	-60
	QYKEDHPFEYRKKEG	KAPKARVPDLDKRKYLVPSDLTVGQF
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPE DALFFFVNN TIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDES SVYGK	-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAE DALFFFVNNVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDES VYGL	-117
	YFLIRKRIHLRPE DALFFFVNN TI	

Figure 1. Alignment of peptide sequences used to produce anti-GABARAPL1 antibodies with GABARAPL1 and GABARAP. The human amino-acid sequences (obtained from NCBI or GeneBank databases) of GABARAPL1 (NP_113600) and GABARAP (CAG47031) proteins were aligned using the NCBI Protein BLAST tool. The amino acid sequences of the peptides used to produce anti-GABARAPL1 are highlighted in blue (PTG-NTER, Proteintech, 18721-1-AP) and in green (CHEM-CENT, Chemicon, AB15278). Variation between the GABARAP and GABARAPL1 proteins are shown in red.

higher percentage of acrylamide in the gel and a longer migration time.^{3,13} Immunohistological analysis of the endogenous proteins, however, does not provide an easy alternative to the necessity of specific antibodies. Indeed, many researchers have encountered this problem of cross-reactivity with both their ‘homemade’ and commercially bought antisera and purified antibodies raised against either GABARAPL1 or GABARAP.^{1,2,14} To our knowledge, there are no available antibodies that can differentiate between these two proteins, explaining why so many laboratories have chosen to use the less problematic mRNA-based techniques to overcome this problem and study the expression of these genes *in vivo*. While these studies have allowed for a better characterization and understanding of *gabarapl1* gene expression and regulation, they do not explore GABARAPL1 protein expression and regulation.

In the past, GABARAPL1 has been the subject of only a handful of studies, while most laboratories focused their efforts on other members of the GABARAP and LC3 families such as GABARAP, GATE-16 and LC3 as well as the yeast homolog, Atg8. Our recent paper establishing GABARAPL1 as a new autophagic marker, however, may trigger a new wave of research on this protein. The interest in GABARAPL1 functionality, in particular in the brain where it is the most highly expressed gene of the family,¹⁵ is likely to grow in the future. Before that time comes, we wish to present several pieces of data explaining our concerns about the detection of the GABARAPL1 protein *in vitro* and *in vivo* in regards to its high homology with the GABARAP protein.

Results

In this work, we studied three anti-GABARAPL1 antibodies among those that are commercially available: one directed against the full-length GABARAPL1 protein (PTG-FL, 11010-1-AP, Proteintech), a second raised against a short peptide sequence at the N-terminal of the protein (PTG-NTER, amino acids 4–18, QYK EDH PFE YRK KEG, 18721-1-AP, Proteintech) and a third raised against a longer peptide sequence in the center of the protein (CHEM-CENT, amino acids 35–84, KAP KAR VPD LDK RKY LVP SDL TVG QFY FLI RKR IHL RPE DAL FFF VNN TI, AB15278, Chemicon) (Fig. 1). All antibodies used are rabbit polyclonal antibodies. It is noteworthy that no monoclonal

antibody directed against either GABARAPL1 or GABARAP is currently available.

To investigate the specificity of these antibodies against denatured GABARAPL1 and GABARAP, we performed protein gel blot analysis with HEK293 WT and FLAG-GABARAPL1-6HIS stably expressing HEK293 cell lysates (Fig. 2A). Antibodies directed against the FLAG peptide and Actin were used as internal controls of FLAG-GABARAPL1-6HIS protein expression and total amounts of loaded proteins, respectively. While these cell lines both express an easily detectable amount of GABARAP, endogenous GABARAPL1 expression is very weak, necessitating the use of the FLAG-GABARAPL1-6HIS stably transfected HEK293 cell line in order to more easily visualize GABARAPL1 in these lysates. All three antibodies tested displayed a relatively strong signal at approximately 18 kDa in size (Fig. 2A, lanes 1, 3 and 5), corresponding to FLAG-GABARAPL1-6HIS in the stably expressing cell line. In addition, the antibody raised against a central peptide of the GABARAPL1 protein (CHEM-CENT) revealed a second very intense band at approximately 15 kDa in size (Fig. 2A, lanes 5 and 6), corresponding to endogenous GABARAP. Surprisingly, despite the presence of a stably expressed recombinant GABARAPL1 protein this antibody produced a prominent band for the endogenous GABARAP protein, suggesting that this antibody equally recognizes the two proteins.

Given that protein-antibody interactions can vary depending on the amount of protein expressed, we chose to confirm these results with transient transfections of either GFP-GABARAPL1 or GFP-GABARAP prior to protein gel blot analysis of the protein lysates (Fig. 2B). An antibody directed against GFP was used as an internal control of the fusion proteins’ expression in the cells. In accordance with the previous results, the antibody raised against the central peptide (CHEM-CENT) displayed a 40 kDa band for both GFP-GABARAPL1 and GFP-GABARAP (Fig. 2B, lanes 5 and 6). In contrast, when GABARAPL1 and GABARAP are overexpressed, only one antibody of the two previously identified to be specific remained so. The antibody produced with the N-terminal peptide (PTG-NTER) detected both the GFP-GABARAPL1 and the GFP-GABARAP (Fig. 2B, lanes 1 and 2), suggesting that this antibody is not specific when both proteins are overexpressed. The antibody directed against the full-length peptide (PTG-FL), however, continued to identify only the GABARAPL1 protein (Fig. 2B, lane 3), producing only one signal corresponding to the

GFP-GABARAPL1. These results suggest that this antibody remains specific to GABARAPL1 whatever the levels of overexpressed proteins.

In order to examine the ability of these antibodies to discern between native GABARAPL1 and GABARAP, we performed liquid phase inhibition experiments followed by immunohistochemical analysis. Given the known high expression of *gabrarapl1* mRNA in the mouse brain and the fact that GABARAPL1 intervenes in the transport of neuronal receptors, we chose to conduct these studies on mouse cerebral sections. The respective antibodies were incubated alone or with either full-length recombinant FLAG-GABARAPL1-6HIS or FLAG-GABARAP-6HIS for two hours prior to incubation on mouse coronal brain sections overnight followed by classical immunofluorescent detection methods. Staining intensity was then analyzed throughout the slice and representative images of three separate experiments were taken in the cortex. In the presence of the individual antibodies alone, the visible staining pattern varied from one antibody to another. The antibody raised against the full-length protein (PTG-FL) displayed the highest background and marked the cytoplasm of cells with a more intense vesicular staining within the cytoplasm as well as a fainter fiber-like staining pattern (Fig. 3A). The antibody raised against the N-terminal of the GABARAPL1 protein (PTG-NTER) displayed a similar staining pattern although the background staining was drastically reduced and fibril-like staining increased (Fig. 3D). Finally, the third antibody, raised against the central part of the GABARAPL1 protein (CHEM-CENT), displayed a much weaker signal in the cytoplasm of cells and a more prominent vesicular pattern throughout the section (Fig. 3G). After incubation with the FLAG-GABARAPL1-6HIS protein, all three antibodies were attenuated and little to no positive staining could be found in the corresponding sections, indicating that all three antibodies clearly recognize the GABARAPL1 protein in its native form (Fig. 3B, E and H). The results obtained from the incubation with the FLAG-GABARAP-6HIS protein, however, differed depending on the antibody in question. Incubation of the PTG-FL antibody with recombinant GABARAP did not appear to affect staining intensity at all (Fig. 3C), demonstrating that under the conditions used, this antibody is capable of distinguishing between GABARAPL1 and GABARAP. Incubation of the PTG-NTER antibody with recombinant GABARAP produced the exact opposite effect, with a complete attenuation of the visible signal on the corresponding tissue section (Fig. 3F). This was surprising since this antibody showed some specificity in protein gel blot experiments (Fig. 2). Finally, recombinant GABARAP, when incubated with the antibody produced by immunization with the central peptide (CHEM-CENT), reduced staining in the last experiment to about the same extent as incubation with recombinant GABARAPL1 (Fig. 3I). The two antibodies produced against peptide sequences within the GABARAPL1 protein were

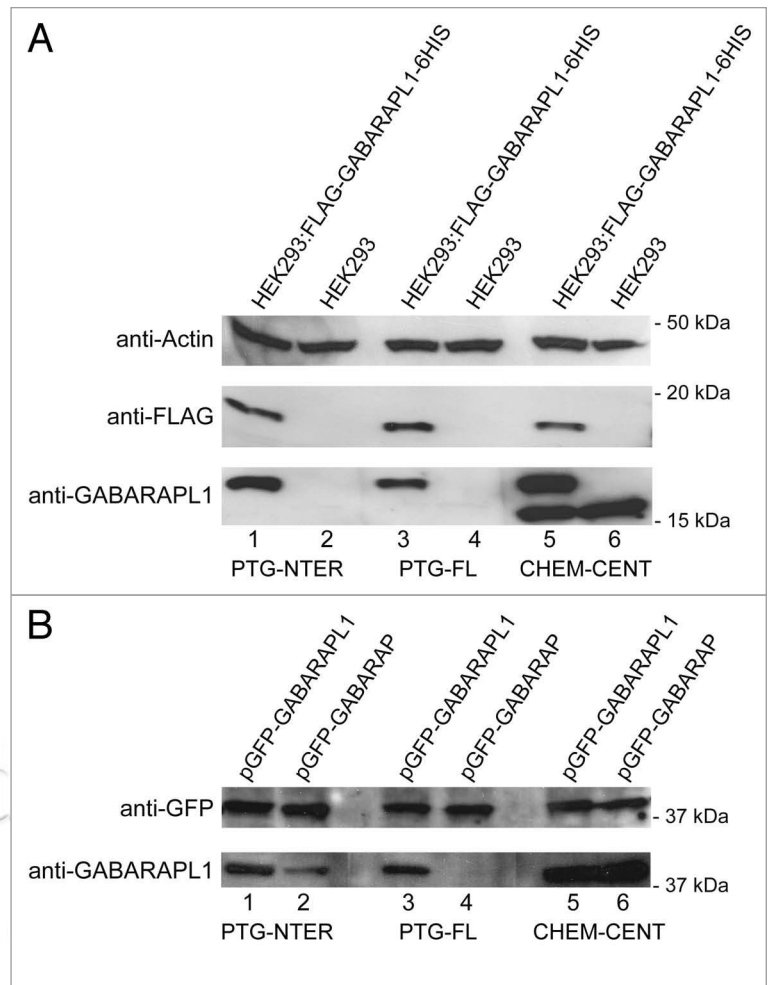


Figure 2. Western blot analysis of anti-GABARAPL1 antibodies specificity. Western blot analysis of HEK293 and HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS cells (A) and HEK293 cells transiently transfected with a GFP-GABARAP or a GFP-GABARAPL1 vector (B). Whole cell lysates (20–40 μ g) were loaded on a 12% or 15% SDS-PAGE and protein gel blotting experiments were performed using three different anti-GABARAPL1 antibodies directed against the N-terminus (PTG-NTER), the full-length protein (PTG-FL) or the center of the protein (CHEM-CENT) and control antibodies (anti-GFP, anti-FLAG M2 and anti-Actin). A representative experiment of 3 performed is shown.

inhibited by incubation with recombinant GABARAP, suggesting that, under the conditions used, these antibodies also recognize this homolog protein.

Discussion

In this work, we studied the characteristics of three different anti-GABARAPL1 antibodies in protein gel blot and immunohistochemical analysis. With the exception of the anti-ATG8L antibody from Protein Tech Group (PTG-FL), these antibodies are described to be specific to GABARAPL1, implying that they do not recognize the closest homolog, GABARAP.

Using HEK293 cell lysates, we demonstrated that the antibodies tested displayed differing affinities for the denatured forms of GABARAPL1 and GABARAP. Of the antibodies that

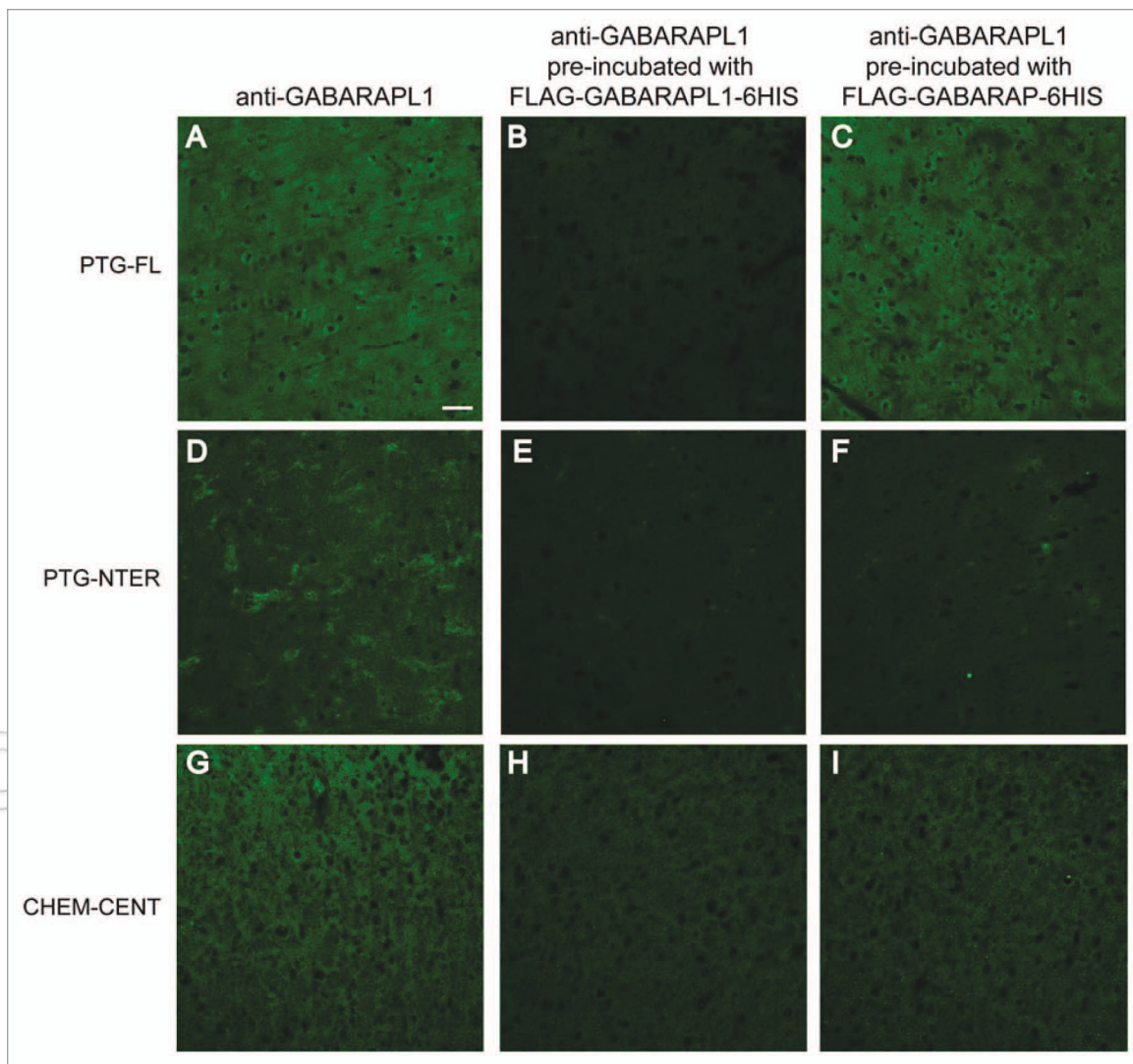


Figure 3. Immunohistochemical analysis of blocking protein experiments. Immunohistochemical analysis of rat brain tissue with anti-GABARAPL1 antibodies. One μ l of pure anti-GABARAPL1 antibody was pre-incubated in either PBST alone, 0.5 nmol FLAG-GABARAP-6HIS in PBST or 0.5 nmol FLAG-GABARAPL1-6HIS in PBST for 2 h before incubation on rat brain sections overnight as described in the material and methods. Scale bar represents 20 μ m.

we chose, the antibody raised against a peptide sequence within the central part of the GABARAPL1 protein was the least efficient at discerning between the two proteins but, surprisingly, this antibody displayed a higher affinity for these proteins. Finally, the antibodies, raised against the N-terminus and the full-length protein, appear to be able to distinguish between the two homolog proteins under the conditions used. It is worth noting, however, that even these antibodies have, under other conditions, recognized the recombinant GABARAP protein in protein gel blotting experiments¹⁶ and one must therefore be vigilant of the protocol used when using these antibodies for GABARAPL1 detection. Our protein gel blot experiments indicated that the PTG antibodies seem to be specific of GABARAPL1 but when we analyzed their specificity *in vivo*, we observed some differences. Indeed, when we pre-incubated each antibody with either GABARAP or GABARAPL1 before performing an immunohistochemistry staining on mouse brain sections, we observed that

only the PTG-FL antibody showed a specific staining, which was inhibited by a pre-incubation with the GABARAPL1 protein and not the GABARAP protein. All together, our results demonstrate that only the PTG-FL antibody seems to be specific of GABARAPL1 *in vitro* and *in vivo*.

In the past, our studies have utilized alternatives to endogenous protein detection such as mRNA expression or overexpression of a recombinant GABARAPL1, due to the lack of available antibodies. The identification of only one of the two homologs has been limited, making it difficult to associate the cellular roles being examined to one protein or the other. Although the conclusions obtained regarding the fundamental function of these two molecules in the cells remain valid, there is some doubt about the real implication of each of these proteins separately in the roles identified.

To conclude, experimenters should be very careful when working with anti-GABARAP and GABARAPL1 antibodies for

both in vitro and in vivo detection since they most likely cross-react and detect both proteins simultaneously. It would be judicious to either first demonstrate the degree of specificity of the antibody or intentionally target the two proteins together, as has previously been demonstrated for siRNA experiments.¹⁷ In the future, the production of specific monoclonal antibodies would be more than useful to further characterize the function of each protein independently in vivo, as they have been described as playing an important role in various cellular and physiological processes such as apoptosis, autophagy, brain receptor transport or tumor progression.

Materials and Methods

Animals. All animal care and experimental protocols adhere to the institutional guidelines. Cerebral tissue from an adult male Sprague Dawley rat was used for competing protein experiments.

Vectors. To construct the psBET-FLAG-GABARAP-6HIS and psBET-FLAG-GABARAPL1-6HIS vectors, *gabapap* and *gabapapl1* cDNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the pcDNA3.1-*gabapap* and pcDNA3.1-*gabapapl1*,¹⁸ plasmids using the following primers: 5'-AAA TCT AGA ATG AAG TTC GTG TAC AAA GA-3' and 5'-TTT GGA TCC CAG ACC GTA GAC ACT TTC GT-3' for *gabapap* and 5'-AAA TCT AGA ATG AAG TTC CAG TAC AAG GA-3' and 5'-TTT AGA TCT CTT CCC ATA GAC ACT CTC AT-3' for *gabapapl1*. The protocol used the following settings: 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 54°C for 30 sec, and 72°C for 1 min and one final extension at 72°C for 10 min. The reactions were performed in a 25 µl volume containing 0.2 µM of each primer, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 15 ng of template DNA and 1 U of Go Taq DNA Polymerase (Promega, M3171). The PCR fragments were then purified using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, 740609.10) and ligated into the pGEM-T easy vector (Promega, A1360) using a T4 DNA ligase (Promega, M1801) according to the manufacturer's protocol. The *gabapap* and *gabapapl1* cDNA were then digested with *Xba*I (Fermentas, FD0684) and BamHI (Fermentas, FD0054) or BglIII (Fermentas, FD0083), respectively and subcloned into the psBET-Flag/6His vector¹⁹ to produce the psBET-FLAG-GABARAP-6HIS and psBET-FLAG-GABARAPL1-6HIS vectors, respectively. Plasmid sequences were confirmed by DNA sequencing using the previously described method in reference 20 (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Recombinant protein expression and purification. BL21-DE3 *E. coli* transformed with psBET-FLAG-GABARAP-6HIS or psBET-FLAG-GABARAPL1-6HIS were grown in 100 ml Luria-Bertani (LB) broth in the presence of 100 µg/ml kanamycin at 37°C. Protein expression was induced with 0.5 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 h. Bacteria were then pelleted at 5,000 g for 10 min at 4°C and resuspended in 5 ml of Sonication buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.2–7.3, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 500 mM KCl, 10 mM Imidazole, 10 mM β-EtSH, 1 mg/ml lysozyme) per gram of bacteria. The bacterial solution was then incubated on ice for 30 min and sonicated three times for 15 sec (Sonic and Materials)

followed by a second centrifugation at 20,000 g for 30 min at 4°C to clear the lysates. The FLAG-GABARAP-6HIS and FLAG-GABARAPL1-6HIS recombinant proteins were then purified using a Ni-NTA Agarose column Purification System (Qiagen 30210) according to the manufacturer's protocol. Briefly, protein lysates were incubated with 500 µl of packed Ni-NTA resin per 500 ml bacterial culture for 2 h at 4°C. The resin was then centrifuged at 5,000 g for 5 min at 4°C and washed three times with at least two volume equivalents of Wash buffer [20 mM TRIS-HCl, pH 7.2–7.3, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 100 mM KCl, 20 mM Imidazole, 10 mM β-EtSH, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] followed by a centrifugation at 10,000 g for 1 min at 4°C. The purified protein was eluted by incubation with two volume equivalents of Elution buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.2–7.3, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM β-EtSH, 0.5 mM PMSF) containing increasing concentrations of Imidazole (100–500 mM). Recombinant protein concentration was determined by comparison to a range of known BSA quantities on a 12.5% SDS-PAGE followed by Coomassie staining.

Cell culture. HEK293 (Human Embryonic Kidney) and HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, PAA, E15-891) supplemented with 2 mM Stable L-Glutamine (PAA, M11-006), 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, 15140) and 10% fetal bovine serum (FBS, PAA, A15-101) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Transient transfection of the HEK293 cells plated in a 6-well plate was accomplished with 500 ng of either pGFP-GABARAP or pGFP-GABARAPL1 and 1 µl of TransFast reagent (Promega, E2431) per well, following the manufacturer's instructions.

Tissue fixation and cryoprotection. Animals were anaesthetized by an intraperitoneal (i.p.) injection of 7% chloral hydrate (ROTH, K318.3) and perfused as previously described in reference 21, with 0.9% NaCl followed by ice-cold 1% paraformaldehyde (PFA, ROTH, 0335.4) fixative in PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄). Extracted brains were subsequently post-fixed in 1% PFA for several hours at 4°C and cryoprotected by saturation in a 15% sucrose solution (Sigma, 17 994-9) at 4°C overnight. Tissues were frozen on dry ice in OCT (Tissue Tek 4583), sectioned into 10 µm sections at -20°C using a cryostat-microtome (Microm, HM560) and placed on gelatin-coated slides (ROTH, 4275.1) and stored at -40°C.

Immunohistochemistry. For immunohistochemical staining, slides were prepared by rehydrating in PBS-T (PBS with 0.3% Triton X100) for three 5-min washes at room temperature. Tissue was subsequently incubated with the appropriate primary antibody dissolved in milk diluant (PBS-T containing 1% bovine serum albumine, 10% lactoproteins and 0.01% sodium azide) overnight at room temperature. Primary antibodies used include: anti-ATG8L (PTG-FL, rabbit polyclonal, Proteintech, 11010-1-AP, 1:200), anti-GABARAPL1 (PTG-NTER, rabbit polyclonal, Proteintech, 18721-1-AP, 1:200), anti-GABARAPL1 (CHEM-CENT, rabbit polyclonal, Chemicon Millipore, AB15278, 1:200). Slides were then washed three times with PBS-T for 5 min each at room temperature before being incubated with the

appropriate secondary antibody diluted in milk solution for 1 h at room temperature. The secondary antibody used was the Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11034, 1:800). Finally, the slides were washed with PBS-T three times for 5 min and coverslips were mounted with 70:30 glycerol:PBS-T.

Competing protein experiments. For immunohistochemical protein competing experiments, antibodies were incubated with either 0.05 or 0.5 nmol of purified recombinant protein (FLAG-GABARAP-6HIS or FLAG-GABARAPL1-6HIS) per 1 μ l of pure antibody (either anti-ATG8L from Proteintech at 0.247 μ g/ μ l, anti-GABARAPL1 from Proteintech at 0.773 μ g/ μ l, or anti-GABARAPL1 from Chemicon at 0.62 μ g/ μ l) diluted in PBS-T experiments for 2 h prior to detection experiments as described above.

Confocal microscopy. Tissue sections were examined with a fluorescence laser scanning confocal microscope Fluoview FV1000 BX (Olympus, France) and images were captured with a 40x/0.75 NA objective and a DP 75 numeric camera using the Fluoview FV1000 software (Olympus, France). All figures were assembled using Adobe Illustrator CS software.

Western blot analysis. Cells were lysed using the following lysis buffer: [50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, protease inhibitor cocktail (Sigma, P8340)]

then 20–40 μ g of cell lysates were resolved on a 12% or 15% polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris base, 200 mM glycine and 0.1% SDS) at 120 V, using a Biorad Power Pack 1000. Proteins were transferred onto Immobilon-P PVDF 0.2 μ m membranes (Biorad, 1620177) for 1 h at 4°C at 100 V in protein gel blot transfer buffer (25 mM Tris base, 200 mM glycine and 10% methanol). Membranes were subsequently blocked in TBS-T (199 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 1.36 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% skim milk powder. Membranes were blotted with antibodies diluted in TBS-T supplemented with 0.5% skim milk against ATG8L (PTG-FL, rabbit polyclonal, Proteintech, 11010-1-AP, 1:2,000), GABARAPL1 (PTG-NTER, rabbit polyclonal, Proteintech, 18721-1-AP, 1:2,000), GABARAPL1 (CHEM-CENT, rabbit polyclonal, Chemicon Millipore, AB15278, 1:2,000), GFP (rabbit polyclonal, Millipore, AB3080, 1:5,000), FLAG M2 (mouse monoclonal, Sigma, F1804, 1:1,000) and Actin (rabbit polyclonal, Sigma, A5060, 1:3,000). The secondary antibody horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG was prepared in TBS-T containing 0.5% skim milk powder. Binding of antibodies to membranes was detected by Enhanced Chemiluminescence Plus Reagent (ECL Plus, GE Healthcare Life Sciences, RPN2132), according to the manufacturer's protocol.

References

- Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48; PMID:15530441; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.072>.
- Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:7983-93; PMID:16431922; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509805200>.
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:495-505; PMID:20404487; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.4.11819>.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB. Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* 2002; 33:63-74; PMID:11779480; [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00558-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00558-X).
- Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:637-44; PMID:12507496; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02907-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02907-8).
- Stangler T, Mayr LM, Willbold D. Solution structure of human GABA(A) receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation. *J Biol Chem* 2002; 277:13363-6; PMID:11875056; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200050200>.
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* 2000; 19:1494-504; PMID:10747018; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.7.1494>.
- Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J* 1998; 17:3597-607; PMID:9649430; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.13.3597>.
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, et al. Cloning, expression patterns and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* 2001; 74:408-13; PMID:11414770; <http://dx.doi.org/10.1006/geno.2001.6555>.
- Mann SS, Hammarback JA. Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A(MAP1A) and MAP1B. *J Neurosci Res* 1996; 43:535-44; PMID:8833088; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960301\)43:5<535::AID-JNRS>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<535::AID-JNRS>3.0.CO;2-J).
- Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* 1994; 269:11492-7; PMID:7908909.
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, et al. A novel early estrogen-regulated gene *gce1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25; PMID:11374880; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4908>.
- Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY. Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* 2011; 286:15106-15; PMID:21388957; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.230896>.
- O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H. GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* 2005; 22:2644-8; PMID:16307606; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04448.x>.
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of *gabarap*, *gce1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1073:83-7; PMID:16458273; <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.004>.
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, et al. Specific regional distribution of *gce1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15; PMID:18423580; <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.077>.
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosomal biogenesis. *EMBO J* 2010; 29:1792-802; PMID:20418806; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.74>.
- Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of *gabarap11* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1024-31; PMID:20197771; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605568>.
- Schenk PM, Baumann S, Mattes R, Steinbiss HH. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs. *Biotechniques* 1995; 19:196-8; PMID:8527135.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *1977. Biotechnology* 1992; 24:104-8; PMID:1422003.
- Brischoux F, Fellmann D, Risold PY. Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis. *Eur J Neurosci* 2001; 13:1733-44; PMID:11359525; <http://dx.doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01552.x>.

2)-Etude de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans différentes lignées cellulaires

Des études précédentes effectuées au laboratoire ont montré que l'expression des ARNm *gabarap* et *gabarapl1* est fortement diminuée dans différentes lignées de cellules cancéreuses (Nemos *et al.*, 2003) :

- 2 lignées de lymphomes de Burkitt (Daudi et Raji) ;
- 3 lignées cellulaires issues de patients atteints de leucémies (HL-60, myéloblastique ; MOLT-4, lymphoblastique T et K-562, érythroblastique) ;
- 1 lignée de carcinome de poumon (A549) ;
- 1 lignée d'adénocarcinome colorectal (SW480) ;
- 1 lignée dérivée du cancer du col de l'utérus (HeLa).

Ces expériences ont été effectuées avec des sondes spécifiques dirigées contre les régions UTR-3' des ARNm car il n'existait pas, à cette époque, d'anticorps spécifique contre la protéine GABARAPL1.

Après avoir montré que l'anticorps ProteinTech (PTG-FL, 11010-1-AP) différenciail les deux protéines *in vitro* et *in vivo*, nous avons mené une étude plus large de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, immortalisées ou primaires. Nous avons également étudié l'expression de deux homologues de GABARAPL1, les protéines GABARAP et LC3B et un marqueur de l'activité autophagique, la protéine p62. Les lignées suivantes ont été étudiées :

- 3 lignées dérivées de cancer du sein (MCF-7, MDA-MB231, MDA-MB436) ;
- 1 lignée dérivée de cancer du col de l'utérus (HeLa) ;
- 3 lignées dérivées de patients atteints de leucémies (HL60, myéloblastique ; U937, monocyttaire ; et NB4, promyélocytaire) ;
- 1 lignée dérivée de neuroblastome (SKN-BE) ;
- 1 lignée de rat dérivée de phéochromocytome (PC12) ;
- 4 lignées immortalisées par l'antigène grand T du SV40 (fibroblastes de souris MEF ; cellules d'endomètre de cobaye S1A5 ; cellules rénales de singe COS7 ; fibroblastes de poumon humain MRC-5) ;
- 1 lignée immortalisée par l'adénovirus 5 (cellules embryonnaires de rein humaines HEK293) ;
- des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF).

Des lysats protéiques des différentes lignées ont été préparés puis l'expression de GABARAPL1 a été étudiée par western-blotting grâce à l'anticorps spécifique de la protéine GABARAPL1 (11010-1-AP, ProteinTech). La protéine GABARAP, quant à elle, a été révélée en même temps que GABARAPL1, par l'anticorps non spécifique anti-GABARAPL1 obtenu chez Chemicon (Chakrama *et al.*, 2010).

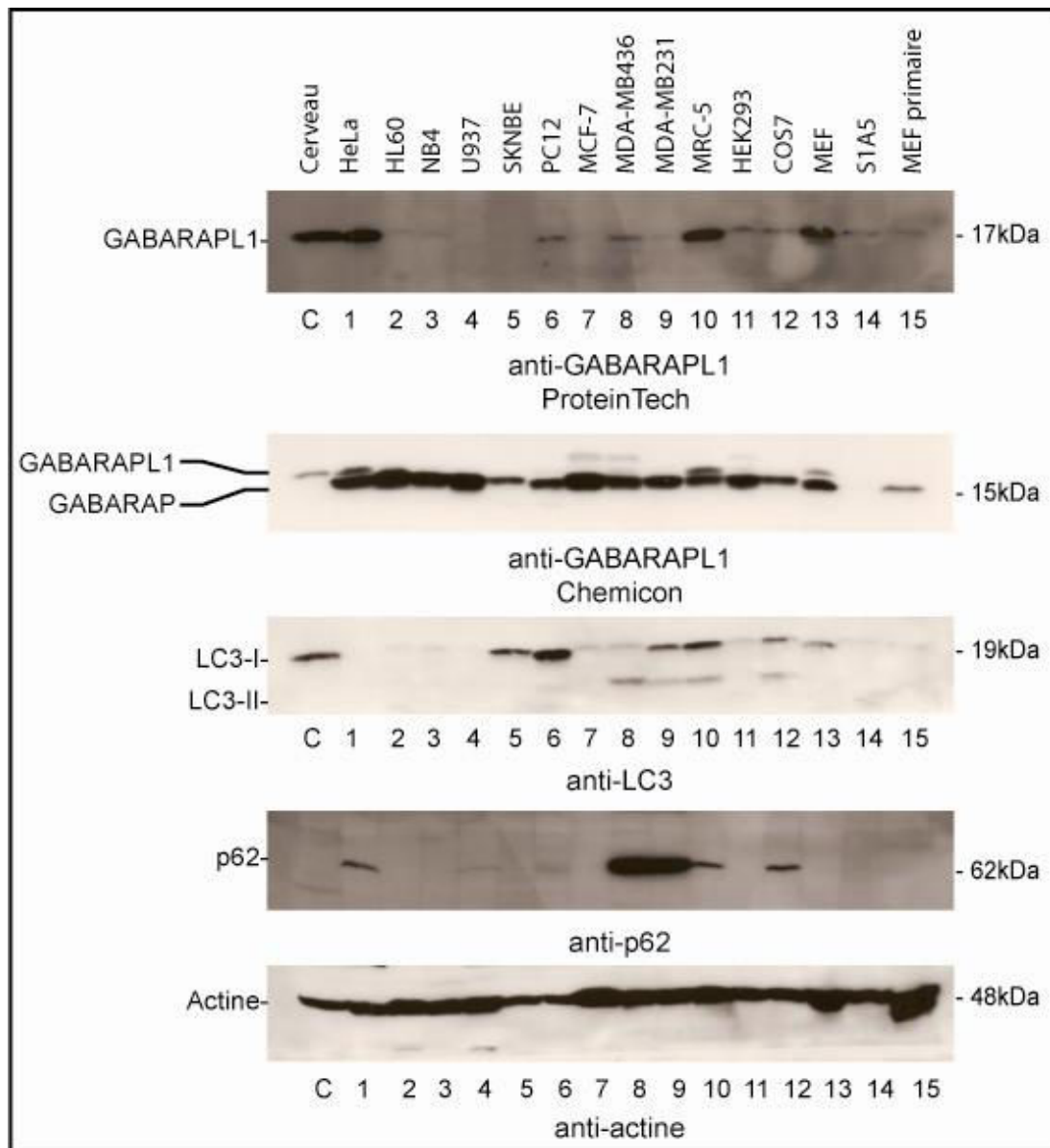


Figure 18: Expression de la protéine GABARAPL1 dans différentes lignées cellulaires. 50 µg de protéines totales ont été chargées sur un gel 15 %. La révélation a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 (Protein Tech, 1/1000° ; Chemicon, 2000°), Actine (1/3000°), LC3 (1/3000°), p62 (1/1000°) et le kit de bioluminescence ECL Plus. C : Extrait protéique de cerveau de rat.

Comme le montre la figure 18, dans les lignées cellulaires non cancéreuses (MRC-5, HEK293, COS7, MEF, S1A5 et MEF primaire, pistes 10 à 15), un niveau basal d'expression

de GABARAPL1 est détecté avec une expression plus élevée dans les cellules MEF immortalisées et MRC-5.

Dans les lignées cellulaires cancéreuses (pistes 1 à 9), l'expression de la protéine GABARAPL1 est variable. Ainsi, elle est indétectable dans les cellules U937, SKNBE et MCF-7 (pistes 4, 5 et 7) et très faiblement exprimée dans les cellules HL60, NB4 et MDA-MB231 (pistes 2, 3 et 9). Un niveau moyen d'expression, comparable à celui observé dans les cellules normales HEK293 et COS7 (pistes 11 et 12), a été détecté dans les lignées cancéreuses PC12 et MDA-MB436 (pistes 6 et 8). Par contre, la plus forte expression de GABARAPL1 endogène, comparable à celle observée dans le cerveau de rat, a été observée dans la lignée HeLa (piste 1).

L'utilisation de l'anticorps anti-GABARAPL1 (Chemicon) non spécifique a permis de détecter deux signaux : le premier migrant à une taille de 17 kDa correspond à la protéine GABARAPL1 et le second migrant plus loin correspond à la protéine GABARAP. Nous avons alors observé que dans les cellules non cancéreuses (pistes 10 à 15), GABARAP est exprimée à des niveaux à peu près équivalents dans toutes les lignées sauf dans les cellules S1A5 (piste 14) où elle est indétectable. Dans les lignées cancéreuses (pistes 1 à 9), GABARAP est détectée dans toutes les lignées et présente des taux d'expression importants, particulièrement dans les lignées HeLa HL60, NB4, U937 et MCF-7 (pistes 1, 2, 3, 4 et 7). Par ailleurs, l'utilisation de cet anticorps permet également de détecter la protéine GABARAPL1. En effet, une bande de taille supérieure à celle de GABARAP est observée dans les cellules HeLa, MRC-5 et MEF immortalisées (pistes 1, 10 et 13), les trois lignées qui présentent un signal GABARAPL1 important avec l'anticorps spécifique. Il est à noter que dans l'extrait de cerveau de rat, une seule bande correspondant à GABARAPL1 est détectée, démontrant une plus forte expression de GABARAPL1 par rapport à GABARAP dans cet organe. Cela confirme les données obtenues lors de l'étude effectuée sur l'expression des ARNm (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006b).

En ce qui concerne l'expression de la protéine LC3, deux signaux ont été observés : le premier de 19 kDa environ correspond à la forme mature de LC3 (LC3-I) et le second correspond à la forme modifiée de LC3 (LC3-II). Dans les cellules non cancéreuses (pistes 10 à 15), LC3 est très faiblement exprimée dans les cellules HEK293, S1A5 et MEF en culture primaire (pistes 11, 14 et 15). Des taux plus importants sont observés dans les cellules MRC-5, COS7 et MEF immortalisées (pistes 10, 12 et 13) avec apparition de la forme LC3-II dans les lignées MRC-5 et COS7 (pistes 10 et 12). Dans les lignées cancéreuses (pistes 1 à 9), la protéine LC3 est faiblement exprimée dans la plupart des lignées mais présente une forte

expression dans les lignées SKNBE et PC12 (pistes 5 et 6). Par ailleurs, la forme II de LC3 est observée uniquement dans les lignées MDA-MB436 et MDA-MB231 (pistes 8 et 9).

L'activité autophagique a été étudiée dans toutes ces lignées grâce à la détection de la protéine p62. En effet, il a été décrit que la protéine p62 est dégradée par autophagie donc toute augmentation du flux autophagique, caractérisée par une augmentation du nombre d'autophagosomes et donc de la forme -II de LC3, devrait conduire à une diminution des niveaux de p62 dans les cellules. Il a été également décrit dans la littérature que p62 est fortement exprimée dans de des tissus tumoraux, ce qui est en corrélation avec une inhibition de l'autophagie (Zatloukal *et al.*, 2007). D'après la figure 18, la protéine p62 est fortement exprimée dans les lignées de cancer du sein MDA-MB436 et MDA-MB231 (pistes 8 et 9) et plus faiblement exprimée dans les cellules HeLa (piste 1). Dans les cellules non cancéreuses, p62 est seulement détectée dans les lignées MRC-5 et COS7 (pistes 10 et 12). Il est à noter que l'on détecte également une augmentation de la forme -II de la protéine LC3 dans les lignées MDA-MB436, MDA-MB231, MRC-5 et COS7 (pistes 8, 9, 10 et 12). Seule la lignée HeLa (piste 1) présente un taux élevé de p62 mais une absence totale de LC3-I ou LC3-II. Ces données sont donc en contradiction avec l'hypothèse émise mais pourraient être expliquées par un blocage de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et donc une inhibition de la dégradation de LC3-II et p62.

Ces résultats, obtenus sur un nombre restreint de lignées cellulaires, ne nous ont pas permis de dégager un profil d'expression de GABARAPL1 qui puisse être associé à un groupe de lignées cellulaires provenant d'un même organe. Cependant, ces données, obtenues pour la première fois sur la protéine, confirment celles obtenues sur l'expression des ARNm. En effet, nous avons observé une faible expression de cette protéine dans la plupart des lignées cancéreuses (excepté pour les cellules HeLa), comparativement à l'expression dans le cerveau de rat.

Notre étude montre surtout qu'il existe des différences d'expression entre les protéines GABARAPL1, GABARAP et LC3 qui appartiennent à la même famille Atg8. En effet, une variation d'expression de GABARAPL1 et LC3, mais pas de GABARAP, est observée dans toutes ces lignées. De plus, les protéines GABARAPL1 et LC3 présentent un profil d'expression relativement proche pour plusieurs lignées. Par exemple, un niveau d'expression faible voir inexistant des protéines GABARAPL1 et LC3 est observé dans les cellules cancéreuses dérivées de patients atteints de leucémies (HL60, NB4, et U937) alors que la protéine GABARAP est fortement exprimée dans ces cellules. Ces résultats nous permettent

de conclure sur un profil d'expression différent de ces protéines de la même famille et en particulier sur de fortes différences entre les deux homologues, GABARAP et GABARAPL1.

3)-Etude de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans les tissus tumoraux

3.1)-Expression dans les méningiomes

Les méningiomes sont les tumeurs du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Ils représentent environ 20% des tumeurs intracrâniennes primaires et ont une incidence annuelle de 4,4 décès pour 100 000 personnes. Ils sont les plus fréquents chez les femmes et l'âge moyen où l'incidence est la plus élevée est supérieur à 50 ans (Kleihues *et al.*, 2002). Ces tumeurs, qui ont été suggérées pour présenter un caractère hormono-dépendant, se développent à partir de l'arachnoïde, une des leptoméninges qui couvrent l'encéphale et la moëlle épinière. Environ 80% des méningiomes sont considérés comme des tumeurs bénignes à croissance lente. Les méningiomes sont classés d'après leurs caractéristiques histologiques. La classification histologique des méninges a été établie en 2000 et a été mise à jour en 2007 par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (Louis *et al.*, 2007). Cette classification permet de distinguer trois grades différents qui comprennent chacun plusieurs sous-types histologiques.

Une étude précédente, effectuée par PCR semi-quantitative au laboratoire par Fabrice Tolle dans le cadre de sa thèse soutenue en 2008, a montré que l'expression des ARNm *gabarapl1* n'est pas homogène dans les différents sous-types de méningiomes de grade I. Cette étude a été effectuée sur 50 échantillons de méningiomes de grade I et 3 échantillons de méninges saines (Tolle, 2008). Il a notamment été observé que l'expression de *gabarapl1* est diminuée dans les méningiomes psammomateux et que l'expression dans les méningiomes transitionnels et méningothéliaux est supérieure chez les femmes par rapport à ceux provenant d'hommes alors que l'inverse est observé dans les méningiomes psammomateux. Finalement, il a montré que l'expression de *gabarapl1* diminue en fonction de l'âge des patientes.

Nous avons pu poursuivre cette étude au niveau de la protéine sur 22 nouveaux échantillons de méningiomes (21 de grade I et 1 de grade II) et 1 méninge saine obtenus auprès de la Tumorotheque de Besançon (les caractéristiques de ces tumeurs sont décrites dans le Tableau 7).

Numéro	Sexe	Age	Histologie	Grade	Niveau GABARAPL1	Niveau LC3
06-14027	H	64	F	I	++	+
05-14765	H	79	M	I	+++	+
05-09809	H	64	M	I	+++	+
06-10361	H	67	M	I	+++	+++
06-13283	H	59	M	I	++	+
06-05242	F	52	M	I	+++	+
06-14923	F	61	M	I	++	++
06-09959	F	75	M	I	+++	-
06-07222	F	54	M	I	+++	++
06-15612	F	64	M	I	++	++
05-18265	H	56	T	I	++	++
06-05185	H	86	T	I	++	+++
05-19401	F	36	T	I	++	+++
06-00502	F	65	T	I	-	-
06-03631	F	63	T	I	+	+
05-17277I	F	63	T	I	+	+
05-17277II	F	63	Méninge		-	+
06-09728	H	64	P	I	-	-
06-06588	F	52	P	I	+	+++
06-10339	F	85	P	I	+	+
05-18179	F	56	P	I	+	+++
05-20093	H	26	A	II	+++	+++

Tableau 7 : Information sur les méningiomes obtenus de la Tumorothèque de Besançon. Les méningiomes, ont été classés selon la classification de l’OMS (2007). Les méningiomes Fibroblastiques ou fibreux (F), Méningothéliaux (M), Transitionnels ou mixtes (T) et Psammomateux (P) appartiennent au Grade I. L’échantillon Atypique (A) appartient au grade II. Les échantillons 05-17277II et 05-17277I correspondent à une méninge saine et un méningiome Transitionnel, respectivement, provenant de la même patiente. Les intensités relatives des signaux obtenus en western-blotting ont été quantifiées et classées en 4 groupes : (-) expression non détectée, (+) expression faible, (++) expression moyenne et (+++) expression forte.

Les protéines totales ont été extraites de ces échantillons (30 mg de tissu) grâce au kit commercial NucleoSpin RNA-Protein de Macherey-Nagel puis 40 µg de protéines totales de chaque échantillon ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 15%. La détection de la protéine endogène GABARAPL1 a été réalisée par western-blotting grâce à l’anticorps spécifique de

ProteinTech. La même membrane a ensuite été incubée avec un anticorps dirigé contre la protéine LC3. Etant donné le nombre d'échantillons, nous avons chargé nos extraits sur deux gels SDS-PAGE et avons utilisé plusieurs échantillons comme contrôles internes de chargement, migration et transfert (marqués en rouge sur les figures 19 et 20).

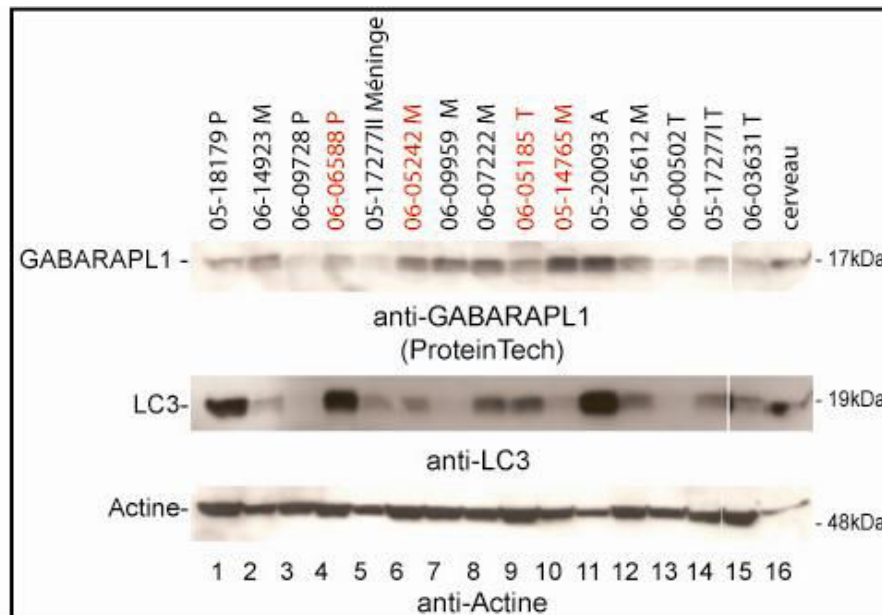


Figure 19 : Expression de GABARAPL1 dans différents méningiomes. Les protéines totales extraites à partir d'extraits de méningiomes ont été chargées sur un gel 15%. La révélation a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 (ProteinTech), Actine et LC3 (dilution 1/1000^e, 1/3000^e et 1/3000^e, respectivement) et le kit de chemiluminescence ECL Plus. En rouge sont indiqués les extraits déposés sur les deux gels et qui servent de contrôle de chargement.

Les résultats obtenus, décrits sur les figures 19 et 20, ont montré que l'expression de la protéine GABARAPL1, ainsi que celle de LC3, varie en fonction des échantillons de méningiomes. En ce qui concerne la protéine GABARAPL1, nous observons une plus forte expression dans les échantillons méningothéliaux par rapport aux échantillons transitionnels et psammomateux. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par PCR quantitative qui montraient une plus faible expression dans les psammomateux. Par contre, en ce qui concerne la protéine LC3, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre l'expression de cette protéine et les différents types de tumeurs (voir les échantillons de psammomateux qui présentent une très forte expression, 06-06588, piste 1, figure 20, ou une très faible voire inexistante expression, 06-09728, piste 3, figure 19). En ce qui concerne les échantillons de méninge saine (05-17277II, piste 5, figure 19) et de grade II (05-20093, piste 11, figure 19), il est impossible de conclure sur un seul échantillon. Néanmoins, on observe que l'expression des deux protéines est non détectée ou faible dans la méninge saine alors que

l'on observe signaux très importants pour les deux protéines dans l'échantillon de grade II (piste 11, figure 19). Il serait donc intéressant d'obtenir plus d'échantillons de ce type afin de pouvoir conclure.

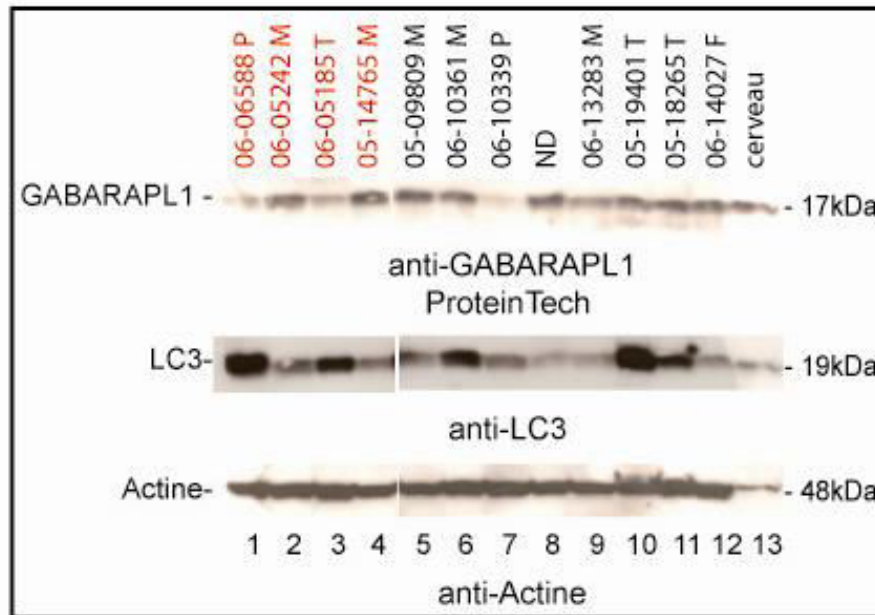


Figure 20 : Expression de GABARAPL1 dans différents méningiomes. Les protéines totales extraites à partir des biopsies de méningiomes ont été chargées sur un gel 15%. La révélation a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 (ProteinTech), Actine et LC3 (dilution 1/1000^e, 1/3000^e et 1/3000^e, respectivement) et le kit de chemiluminescence ECL Plus. En rouge sont indiqués les extraits déposés sur les deux gels et qui servent de contrôle de chargement. ND : échantillon dont l'origine n'a pu être déterminée.

Nous avons ensuite quantifié l'expression relative des échantillons en 4 sous-groupes : (-) expression non détectée, (+) expression faible, (++) expression moyenne et (+++) expression forte. Les résultats de la quantification sont présentés dans le tableau 3. Afin de confirmer ces données préliminaires, nous répétons cette expérience et quantifierons par densitométrie les signaux obtenus afin d'obtenir des données quantitatives. Nous pourrions également augmenter notre cohorte d'échantillons puisque nous possédons encore 40 échantillons provenant de la Tumorotheque de Strasbourg.

3.2)-Expression dans les tumeurs du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Plusieurs classifications sont actuellement utilisées par les cliniciens et pathologistes :

- la classification histologique, qui est en constante évolution, permet de prédire l'évolution des lésions et les divise en hyperplasies, carcinomes *in situ* et carcinomes infiltrants (Dupont & Page, 1985).

- la classification TNM qui décrit trois critères différents d'une tumeur : la taille primaire (T), l'atteinte ganglionnaire (N) et la présence de métastases (M).

- la classification moléculaire, qui repose sur le profil d'expression de marqueurs biologiques. Cette classification permet de cibler les traitements et est utilisée pour le pronostic. Elle regroupe 5 sous-types différents :

- luminaux A et B : ces tumeurs sont caractérisées par l'expression de protéines luminales telles que les cytokératines 8, 18 et 19 et les récepteurs hormonaux (RH) ;

- basal : ce sont des tumeurs de haut grade très agressives et de mauvais pronostic du fait de l'absence de marqueurs ciblés tels que les récepteurs aux hormones (estrogène et progestérone) et la protéine HER2 ;

- HER2 positif : il est associé à des tumeurs de haut grade avec un pronostic mitigé ;

- normal : ces tumeurs sont assez mal définies et présentent un pronostic variable.

Il a été récemment montré au laboratoire que l'expression du gène *gabarapl1* est fortement diminuée dans des cancers du sein et que la forte expression du gène est corrélée à une meilleure survie des patientes et en particulier de celles présentant un envahissement ganglionnaire. L'expression de *gabarapl1* peut donc être considérée comme un facteur de bon pronostic (Berthier *et al.*, 2010). Cette étude rétrospective, faute d'anticorps spécifique, a seulement pu être conduite sur les ARNm.

Afin de compléter ces travaux, nous avons entrepris l'étude de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans des tumeurs du sein de différents grades. Pour cette étude préliminaire, nous avons obtenu 10 tumeurs auprès du CGFL (Centre Georges François Leclerc) de Dijon. Ces 10 échantillons représentent 4 sous-types différents (Luminal A, Luminal B, basal et HER2). Cette étude a été réalisée en aveugle depuis l'extraction des protéines jusqu'à l'analyse du western-blot. Nous avons déposé 20 µg de protéines totales extraites à partir de 30 mg de chaque échantillon sur un gel SDS-PAGE 15%. La détection de la protéine endogène GABARAPL1 a ensuite été effectuée par western-blotting grâce à l'anticorps spécifique de ProteinTech. Nous avons également étudié l'expression des protéines LC3, p62 et Actine.

Comme le montre la figure 21, GABARAPL1 est exprimée de manière non homogène dans les différents échantillons étudiés. Dans tous les échantillons, nous avons observé un

signal d'environ 17 kDa correspondant à la protéine GABARAPL1 mais, même si l'intensité de ce signal varie selon l'échantillon, nous n'avons pas observé de différence caractéristique entre les différents sous-types de tumeurs. Par exemple, l'intensité du signal est équivalente dans les échantillons de grade III HER⁺/RH⁺ (pistes 4 et 8), un échantillon de grade I luminal A (piste 7) ou un échantillon de grade III HER2⁺/RH⁻ (piste 10). Cependant, d'autres signaux ont également été observés dans ces échantillons. En effet, un signal migrant juste en dessous de celui de GABARAPL1 (A) et qui pourrait correspondre à la forme liée aux phospholipides (-II) a été observée dans tous les échantillons mais sans aucune corrélation, encore une fois, avec le grade des tumeurs.

D'autre part, la présence de cette forme -II, spécifique de la formation des autophagosomes et donc de l'augmentation du flux autophagique, n'est corrélée ni à une augmentation de la dégradation de la protéine p62 (par exemple, comparer les échantillons de Grade III basal like, pistes 3 et 11), ni à l'apparition de la forme -II de LC3.

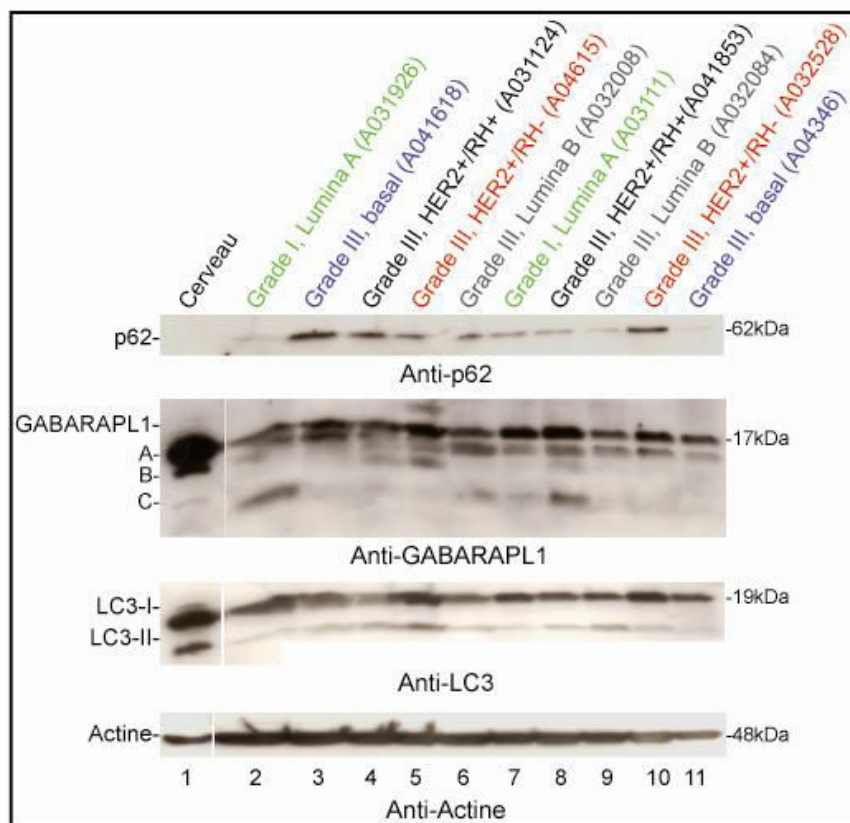


Figure 21 : Expression de GABARAPL1 dans les tumeurs de sein. Les protéines totales (20 µg) extraites à partir de biopsies de tumeurs du sein ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 15%. La révélation a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1, Actine, LC3 et p62 (dilution 1/1000^e, 1/3000^e, 1/3000^e et 1/1000^e, respectivement) et le kit de chemiluminescence ECL Plus. Les signaux A, B et C correspondent à des formes modifiées ou clivées de GABARAPL1.

Par ailleurs, nous avons également détecté, dans certains échantillons (pistes 2, 4, 5, 6, 7 et 8), la présence de signaux supplémentaires migrant beaucoup plus loin que les signaux correspondant aux formes natives, matures ou lipidées de la protéine GABARAPL1 (B et C). Ces signaux pourraient donc correspondre à des produits de clivage. Cette hypothèse pourra être confirmée lors de l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse (voir ci-dessous).

Enfin, un dernier signal de taille supérieure à GABARAPL1 a été observé dans la piste 5 correspondant à un échantillon de grade III HER2⁺/RH⁻. Cette forme modifiée pourrait correspondre à une modification post-traductionnelle de la protéine GABARAPL1. En effet, il a déjà été démontré que la protéine LC3 peut être phosphorylée dans les cellules et qu'elle doit être déphosphorylée avant sa lipidation (Jiang *et al.*, 2010a). D'autre part, des travaux préliminaires en collaboration avec le laboratoire du Dr. Uwe Schlattner (Grenoble) ont montré que la protéine GABARAPL1 est phosphorylée *in vitro*. Cette hypothèse pourra également être vérifiée lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

En parallèle de l'étude de l'expression de GABARAPL1 dans ces tumeurs, une étude du protéome global de ces échantillons par spectrométrie de masse a été entreprise en collaboration avec la plateforme protéomique CliPP (*CLinical and Innovation Proteomic Platform*, Bourgogne/Franche-Comté). D'une part, cette étude protéomique permettra de confirmer la présence de la protéine GABARAPL1 ainsi que les produits de clivage ou modifiés éventuellement présents dans ces échantillons. D'autre part, l'analyse du protéome permettra d'établir une cartographie protéique complète de ces échantillons et donc de déterminer une signature potentielle de ces différents grades. Cette étude est actuellement en cours.

Les échantillons (20 µg de protéines totales) ont été chargés sur un gel 15 % qui a ensuite été coloré avec une solution de coloration appelée Blue Silver (Figure 22) montrant un seuil de détection plus bas que celui de la coloration par le réactif de Coomassie (Candiano *et al.*, 2004). Chaque piste a ensuite été découpée en 56 fragments découpés à leur tour en plusieurs morceaux d'environ 2 mm. Tous les échantillons sont en cours de traitement par la plateforme CliPP dans le cadre d'un financement de la Ligue Régionale contre le Cancer (comité du Doubs) et d'un financement PRES UFC-UB. Les premiers résultats devraient être disponibles d'ici quelques semaines.

En conclusion, nous avons montré que la protéine GABARAPL1 présente une expression variant selon les échantillons analysés. Toutefois, cette étude réalisée sur un nombre limité d'échantillons n'a pas permis de mettre en évidence un lien entre l'expression de GABARAPL1 et le type de tumeur.

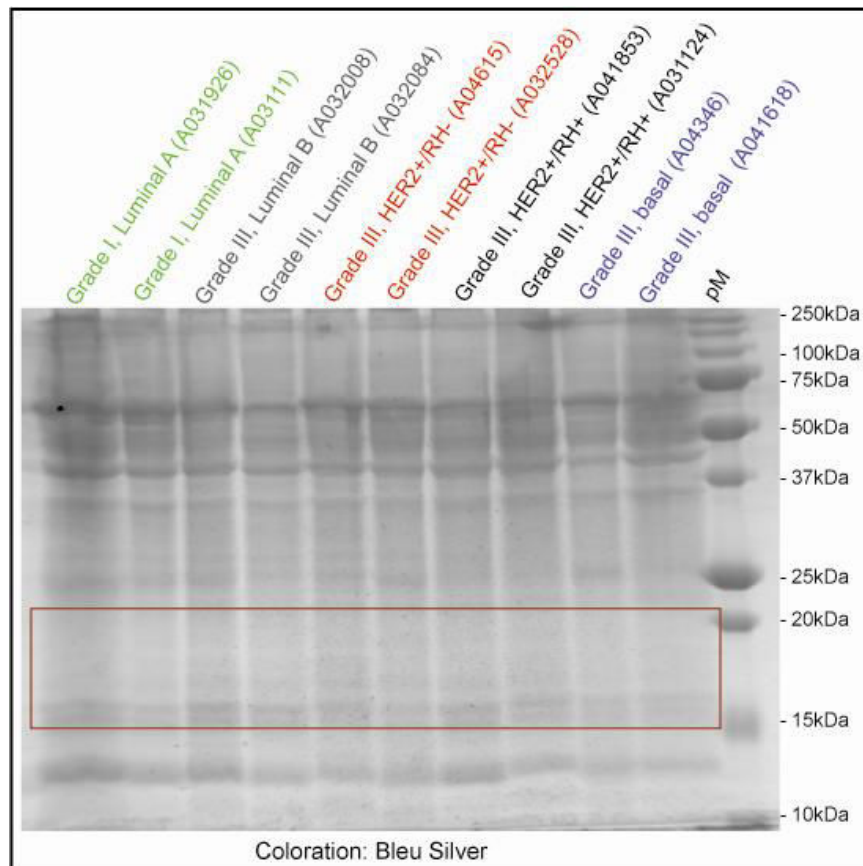


Figure 22 : Expression de GABARAPL1 dans les tumeurs de sein. Les protéines totales (20 µg) extraites à partir de biopsies de tumeurs du sein ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 15%. Les protéines ont été colorées à l'aide du réactif Bleu Silver pendant 2 h puis décolorées avec de l'eau distillée. Le rectangle représente la zone d'expression de la protéine GABARAPL1. pM : poids moléculaire.

Néanmoins nous pouvons tout de même conclure que l'expression de la protéine est détectable dans ces échantillons, ce qui est en contradiction avec les données sur les lignées cellulaires dérivées de cancer du sein où l'expression de la protéine est la plupart du temps non détectable.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu obtenir de caractéristiques significatives sur le taux d'autophagie dans ces tumeurs puisque les résultats obtenus pour LC3-II et p62 ne sont pas corrélés (par exemple, comparer pistes 5 et 11 sur figure 21). En effet, une diminution de la formation des autophagosomes (diminution de LC3-II) devrait être associée à une augmentation du niveau de p62 et inversement.

Néanmoins, nous sommes confiants que les analyses de spectrométrie de masse nous fourniront des données importantes sur les protéines dérégulées dans ces différentes tumeurs et permettront d'identifier une ou plusieurs protéines candidates pour les futures études. Les protéines connues pour être impliquées dans l'autophagie ou la dégradation lysosomale seront ciblées en priorité. La première partie de cette analyse a débuté et porte sur la zone encadrée sur la figure 22 qui correspond à la zone de migration de GABARAPL1 et ses formes modifiées.

III-GABARAPL1 et drogues anti-cancéreuses

Il a été rapporté que l'autophagie est impliquée dans la progression tumorale et qu'elle est responsable, dans certains cas, de la résistance des cellules cancéreuses aux traitements anti-cancéreux. En effet, l'autophagie permet la survie des cellules cancéreuses lors de stress métaboliques générés par les drogues anti-cancéreuses. Actuellement, plusieurs essais cliniques reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie en association avec des drogues anti-cancéreuses (voir le paragraphe "Autophagie et résistance aux drogues anti-cancéreuses" de la partie Rappels bibliographiques) (Chen *et al.*, 2010). Compte tenu de ces informations et afin de comprendre la fonction de GABARAPL1 au cours de la progression tumorale, nous avons posé comme hypothèse de travail que la protéine GABARAPL1 pourrait être régulée par des drogues anti-cancéreuses et jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance à certains composés chimiques thérapeutiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé plusieurs drogues anti-cancéreuses connues pour leur rôle dans l'inhibition du protéasome et l'activation ou l'inhibition de l'autophagie afin de : tester leur effet sur l'expression de GABARAPL1 et, tester la réponse de cellules surexprimant la protéine GABARAPL1 à ces drogues.

1)-Régulation de l'expression de GABARAPL1 par différentes drogues utilisées en thérapie anti-cancéreuse

Au cours de cette partie de mon travail, nous nous sommes demandé si des molécules utilisées en thérapie anti-cancéreuse pouvaient réguler la vie et la mort des cellules cancéreuses *via* la régulation de l'expression de la protéine GABARAPL1 et éventuellement de l'autophagie. Nous avons donc choisi de tester plusieurs composés susceptibles d'affecter la régulation et la fonction de la protéine GABARAPL1 :

- composés inhibiteurs du protéasome qui ont été décrits pour réguler l'expression de la protéine GABARAPL1 (MG132, Lactacystine et Bortezomib) (Seguin-Py *et al.*, article soumis, voir publications annexes) ou de la protéine LC3 (MG132 et Bortezomib) mais également pour réguler le taux d'autophagie (Bortezomib et MG132) (Milani *et al.*, 2009; Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2010) (Gao *et al.*, 2010) ;

- composés anti-estrogéniques, tels que le 4OH-Tamoxifène ou le Raloxifène, décrits pour présenter un effet anti-prolifératif dans les cellules cancéreuses ER⁺ (Jordan & Brodie, 2007). D'autre part, il a été montré que le 4-OH régule également l'autophagie (Qadir *et al.*, 2008) ;

- composés agissant sur la dépolymérisation des microtubules, tels que le Docetaxel, car nous savons que la protéine GABARAPL1 interagit avec la tubuline et que les microtubules sont essentielles pour le transport des autophagosomes et la fusion de ces vésicules avec les lysosomes (Mansuy *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004).

1.1)-Effet du Bortezomib

Lors de nos expériences, nous avons voulu déterminer si le Bortezomib, en association avec des inhibiteurs de l'autophagie, régule l'expression de la protéine GABARAPL1 de manière accrue par rapport au Bortezomib seul (Seguin-Py *et al.*, 2011, article soumis, voir publications annexes) mais surtout, à plus long terme, si cette association de traitements induit la mort des cellules de cancer du sein en lien avec une régulation de l'expression de la protéine GABARAPL1.

Nous avons donc incubé des cellules MCF-7:FLAG-GABARAPL1-6HIS pendant 15 heures avec du Bortezomib (25 nM) en présence ou en absence d'inhibiteurs du flux autophagique : 3-Méthyladénine (10 mM) ou Bafilomycine A1 (500 nM). Les protéines totales ont ensuite été chargées sur un gel 15 % puis les protéines GABARAPL1, LC3, p62 et Actine ont été révélées par western-blotting grâce à des anticorps spécifiques.

Comme le montre la figure 23, en l'absence de stimulation, un seul signal d'un poids moléculaire de 19 kDa qui correspond à la protéine mature FLAG-GABARAPL1-I a été observé (piste 1). Dans ces mêmes cellules non stimulées, les deux formes de la protéine LC3 (I et II) ont été observées témoignant ainsi du niveau d'autophagie basale existant dans ces cellules. Nous observons également un faible taux de protéine p62 (piste 1).

Après inhibition de l'induction de l'autophagie par la 3-Méthyladénine (piste 2), nous observons une légère augmentation du taux des protéines FLAG-GABARAPL1-I, LC3-I et p62. Par contre, nous observons l'apparition d'un signal migrant un peu plus vite que la protéine FLAG-GABARAPL1-I qui correspond à la protéine GABARAPL1-I endogène. Ces augmentations de niveaux de ces protéines sont probablement dues à une inhibition de la formation des autophagosomes et donc à une inhibition de la lipodation des protéines GABARAPL1 et LC3 ainsi qu'une inhibition de leur dégradation, et de celle de p62, dans les lysosomes.

Lorsque les cellules sont traitées par la Bafilomycine A1 (piste 3), un inhibiteur de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, nous observons une augmentation de la quantité de la forme -II de la protéine GABARAPL1 (migrant entre la protéine FLAG-GABARAPL1-I et la protéine endogène GABARAPL1-I). Pour LC3, nous observons

seulement une très légère différence avec l'échantillon contrôle mais cela peut être dû à la forte quantité de forme -II déjà présente dans les cellules non stimulées. Nous observons également une augmentation de la quantité de p62 qui n'est plus dégradée dans les lysosomes.

Les niveaux de protéines FLAG-GABARAPL1-I, GABARAPL1-I endogène, LC3-I et

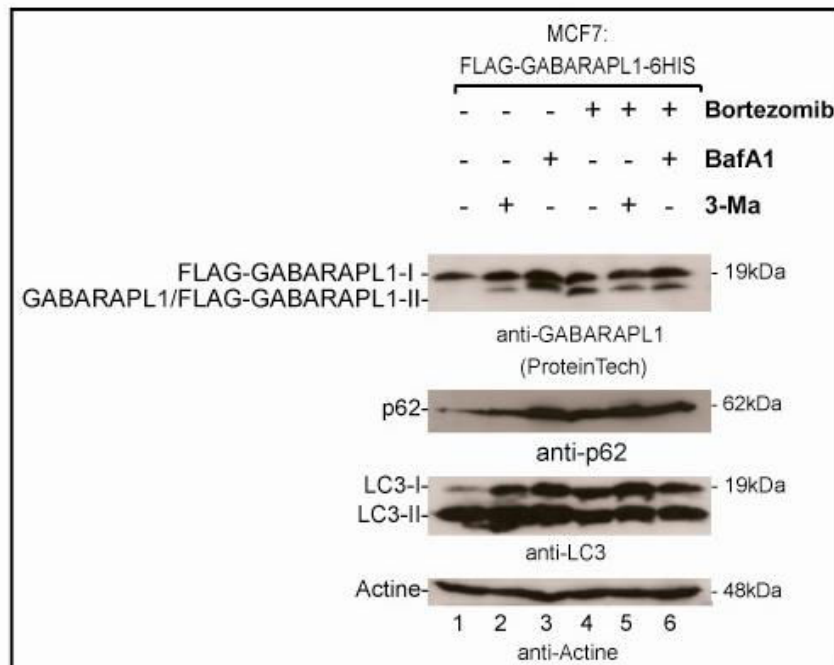


Figure 23 : Expression de GABARAPL1 en réponse au Bortezomib dans les cellules MCF-7:FLAG-GABARAPL1-6HIS. Les cellules ont été traitées avec 25 nM de Bortezomib, 500 nM BafA1, 10 mM de 3-MA ou avec des combinaisons de Bortezomib + BafA1 ou 3-MA pendant 15 h. Les cellules ont ensuite été lysées et les extraits protéiques ont été chargés sur deux gels 15 %. La révélation du premier gel a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 et p62 (dilution 1/1000^e) et la révélation du deuxième gel a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines LC3 et Actine (dilution 1/3000^e).

p62 sont également augmentés par le traitement au Bortezomib (piste 4). En revanche, nous n'observons pas de différence de niveaux de ces protéines lorsque les cellules sont traitées avec les deux composés associés, Bortezomib + 3-Méthyladénine ou Bafilomycine (pistes 5 et 6), par rapport aux niveaux observés dans les cellules traitées par ces drogues seules.

Ces résultats confirment que les niveaux des protéines FLAG-GABARAPL1-I et GABARAPL1-I sont régulés dans les cellules cancéreuses en réponse à des drogues utilisées en thérapie anti-cancéreuse (Bortezomib, 3-MA ou Bafilomycine A1). Des résultats semblables ont déjà été décrits pour la protéine LC3 avec le MG132 et le Bortezomib (Gao *et al.*, 2010; Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2010). Cependant, l'association d'un composé inhibiteur du protéasome et d'un inhibiteur de l'autophagie ou de la voie lysosomale ne semble pas avoir d'effet synergique sur l'expression de GABARAPL1. Cela peut être dû au

fait que les niveaux d'expression sont importants et peuvent donc masquer des effets faibles mais significatifs.

Etant donné que l'autophagie protège les cellules cancéreuses contre la mort cellulaire induite par les conditions de stress induites par des composés chimiques utilisés en thérapie, il sera maintenant intéressant de déterminer si cette augmentation du taux de la protéine GABARAPL1 régule le taux d'autophagie et protège les cellules de cancer du sein contre la mort cellulaire.

1.2)-Autres drogues

Nous avons également testé d'autres drogues chimiques utilisées en thérapie anti-cancéreuse et qui ciblent des voies cellulaires différentes de celle du protéasome. En ce qui concerne le Docetaxel, un agent inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules, et les anti-estrogènes, 4OH-Tamoxifène et Raloxifène, nous n'avons pas observé d'effet sur l'expression de la protéine GABARAPL1.

2)-Régulation de l'action des drogues chimiothérapeutiques dans les cellules MCF-7 surexprimant la protéine GABARAPL1

Au vu de résultats obtenus pour la protéine Beclin1 décrite pour réguler la réponse des cellules MCF-7 aux composés estrogéniques et étant donné l'implication de GABARAPL1 dans l'autophagie, nous nous sommes demandé si la surexpression de GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 pouvait réguler l'effet de composés anti-prolifératifs ou ciblant l'autophagie.

Pour ces expériences, nous avons choisi des composés chimiques décrits comme des inducteurs de l'autophagie mais également pour leur action en tant qu'inhibiteurs de la prolifération des cellules cancéreuses, la Rapamycine et le 4OH-Tamoxifène (Chang *et al.*, 2007; Jordan & Brodie, 2007). La Rapamycine est un inducteur de l'autophagie utilisé régulièrement dans le traitement des cancers. Le 4-OH-Tamoxifène est un anti-estrogène utilisé dans le traitement de certains cancers, en particulier celui du sein, mais qui a également été décrit comme un inducteur de l'autophagie (Bursch *et al.*, 1996; Bursch *et al.*, 2000). Les cellules MCF-7, MCF-7:contrôle et MCF-7:FLAG-GABARAPL1-6HIS ont donc été cultivées en présence de 4OH-Tamoxifène (1 μ M) ou de Rapamycine (10, 100 et 200 nM) pendant 192 heures. Nous avons ensuite effectué un test MTT toutes les 48 heures pendant 8 jours. Les résultats obtenus pour chaque traitement sont exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport au pourcentage de cellules viables de l'échantillon non traité et qui a été fixé à 100 %.

Comme le montre la figure 24, une diminution de la croissance des trois lignées cellulaires a été observée suite à un traitement par le 4OH-Tamoxifène (4OH-Tam). En effet, le 4OH-Tamoxifène diminue la croissance cellulaire de manière significative (15 à 20 %) à partir de 96 h de traitement. Après 8 jours de traitement (192 h), le nombre de cellules viables est diminué de 50% par rapport à la valeur du contrôle (EtOH) et ce pour les trois lignées cellulaires. En revanche, aucune différence n'a été observée entre les trois lignées cellulaires.

Dans l'expérience décrite dans la figure 25, la Rapamycine a été utilisée à différentes concentrations et son effet a été comparé au contrôle non traité (DMSO 0,02 %). Un traitement par 10 nM de Rapamycine pendant 96 h induit une diminution significative du nombre de cellules viables (environ 20 %) et un traitement de 8 jours (192 h), une diminution de 50 %. Des concentrations plus élevées (100 et 200 nM), décrites dans la littérature pour induire l'autophagie, donnent des résultats semblables à ceux obtenus avec la concentration de 10 nM. Comme lors du traitement par le 4OH-Tamoxifène, aucune différence n'a été observée entre les lignées qui surexpriment ou non GABARAPL1. De plus, la concentration ne semble pas influencer sur la réponse de ces lignées à la rapamycine.

Les résultats obtenus montrent que le 4OH-Tamoxifène et la Rapamycine induisent un effet similaire sur la croissance des trois lignées, ce qui suggère que la surexpression de la protéine GABARAPL1 ne potentialise pas l'effet inhibiteur de ces composés sur la croissance des cellules MCF-7.

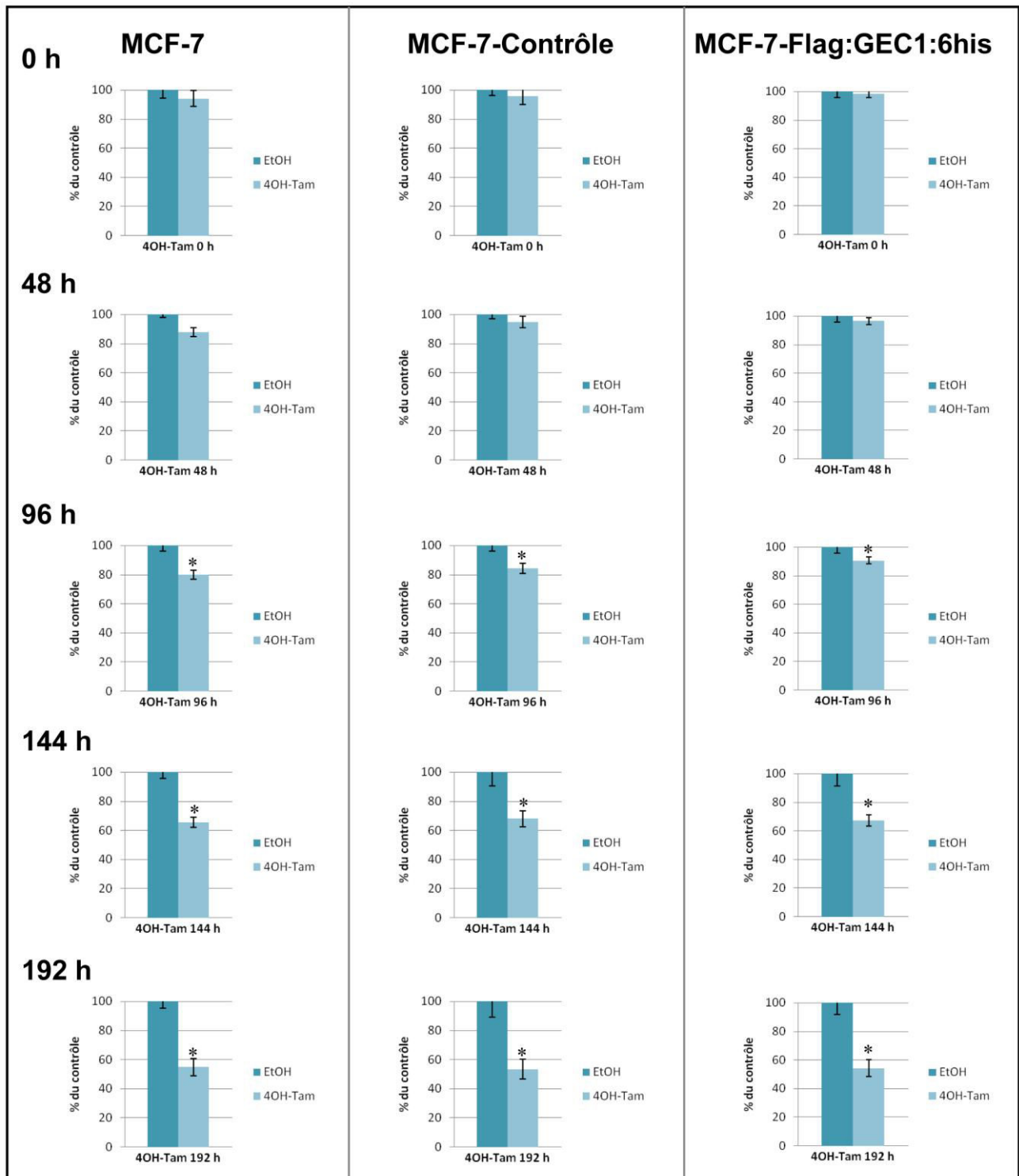


Figure 24 : La surexpression de la protéine GABARAPL1 ne potentialise pas l'effet anti-prolifératif du 4OH-Tamoxifène. Des cellules MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 et MCF-7:Flag-GABARAPL1-6HIS ont été ensemencées en plaque de 96 puits à raison de 3×10^3 cellules par puits. Les cellules ont été incubées avec $1 \mu\text{M}$ 4OH-Tamoxifène (4OH-Tam) 24 h après ensemencement et pendant 10 jours. Les milieux de traitement ont été changés et une plaque a été soumise au test MTT tous les deux jours pour déterminer le nombre de cellules viables par puits. Les cellules contrôles ont été incubées avec 0,01 % éthanol. Les résultats obtenus pour chaque traitement sont exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport au pourcentage de cellules viables de l'échantillon non traité et qui a été fixé à 100 %. Les résultats représentés correspondent à la moyenne de 3 expériences et de 8 puits par expérience pour chaque lignée et traitement. * : $p < 0,05$, significativité par rapport au contrôle (Test de Wilcoxon).

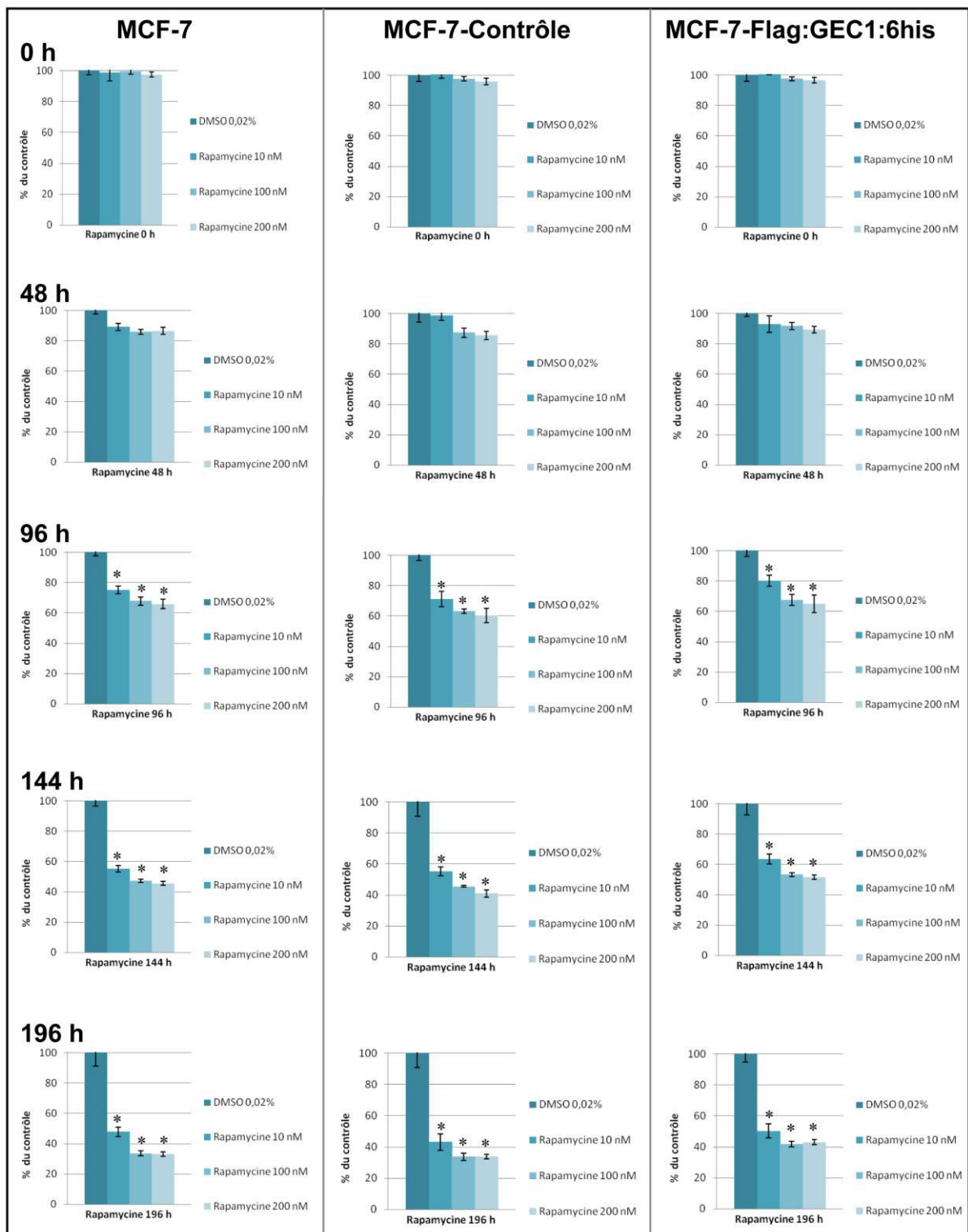


Figure 25 : La surexpression de la protéine GABARAPL1 ne potentialise pas l'effet anti-prolifératif de la rapamycine. Des cellules MCF-7, MCF-7-Contrôle et MCF-7:Flag-GABARAPL1-6HIS ont été ensemencées en plaque de 96 puits à raison de 3×10^3 cellules par puits. Les cellules ont été incubées avec 10 nM, 100 nM ou 200 nM de rapamycine 24 h après ensemencement et pendant 10 jours. Les milieux de traitement ont été changés et une plaque a été soumise au test MTT tous les deux jours pour déterminer le nombre de cellules viables par puits. Les cellules contrôles ont été incubées avec 0,02 % de DMSO. Les résultats obtenus pour chaque traitement sont exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport au pourcentage de cellules viables de l'échantillon non traité et qui a été fixé à 100 %. Les résultats représentés correspondent à la moyenne de 3 expériences et de 8 puits par expérience pour chaque lignée et traitement. * : $p < 0,05$, significativité par rapport au contrôle (Test de Wilcoxon).

IV-Développement de modèles cellulaires pour l'étude du rôle de la protéine GABARAPL1

1)-Etablissement d'une lignée cellulaire stable HEK293 exprimant la protéine mutée FLAG-GABARAPL1-G116A-6his

Au cours de mon travail, j'ai montré que GABARAPL1 est associée au processus autophagique mais des données précédentes obtenues au laboratoire ont également montré que la surexpression de GABARAPL1 dans les cellules HEK293 active leur prolifération (Seguin-Py, 2007). Cependant, aucune donnée ne nous a encore permis de conclure à un lien éventuel entre GABARAPL1, son implication au cours de l'autophagie et une augmentation de la prolifération cellulaire.

Pour répondre à cette question, nous avons donc établi une lignée cellulaire stable HEK293 dans laquelle la protéine GABARAPL1 mutée au niveau de la glycine 116 est surexprimée. Le résidu glycine de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS a été remplacé par une alanine pour donner la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS. Nous avons montré précédemment, par transfection transitoire du vecteur pGABARAPL1-G116A-GFP dans les cellules HEK293, que cette mutation inhibe la maturation de la protéine GABARAPL1 (Chakrama *et al.*, 2010). Il a également été montré que cette mutation inhibe la liaison aux phospholipides, et donc aux autophagosomes, des protéines LC3 et GABARAP (Tanida *et al.*, 2004b; Tanida *et al.*, 2004c).

Dans un premier temps, nous avons voulu valider notre modèle et confirmer que la protéine mutée n'est pas liée à des phospholipides dans cette lignée cellulaire stable (Figure 26). Pour cela, nous avons incubé les cellules HEK293, HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS et HEK293:FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS en présence de NH₄Cl (2 h) ou Bafilomycine A1 (16 h), des inhibiteurs du flux autophagique qui induisent l'accumulation des formes liées aux phospholipides (-II) des protéines de la famille Atg8. Nous avons ensuite chargé les protéines totales sur un gel SDS-PAGE 15 % puis révélé les protéines GABARAPL1 et Actine par western-blotting. Pour la révélation de GABARAPL1, nous avons utilisé un anticorps non spécifique (Chemicon) qui reconnaît également GABARAP.

Comme le montre la figure 26, dans les cellules non induites HEK293 (piste 1), nous observons un seul signal à 15 kDa environ qui correspond à la protéine GABARAP-I. En effet, nous avons montré que dans ces cellules la protéine endogène GABARAPL1 n'est pas détectée avec cet anticorps (Chakrama *et al.*, 2010).

Dans les cellules non induites HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS (piste 4), deux signaux sont observés. Le premier signal d'une taille de 19 kDa (*) correspond à la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS surexprimée et le deuxième migrant plus loin correspond à la protéine GABARAP. Ces protéines sont probablement les protéines matures, clivées au niveau de leur glycine 116, puisqu'il a été montré que ces protéines sont clivées dès leur synthèse dans les cellules (Chakrama *et al.*, 2010). Nous observons donc les protéines FLAG-GABARAPL1-I et GABARAP-I.

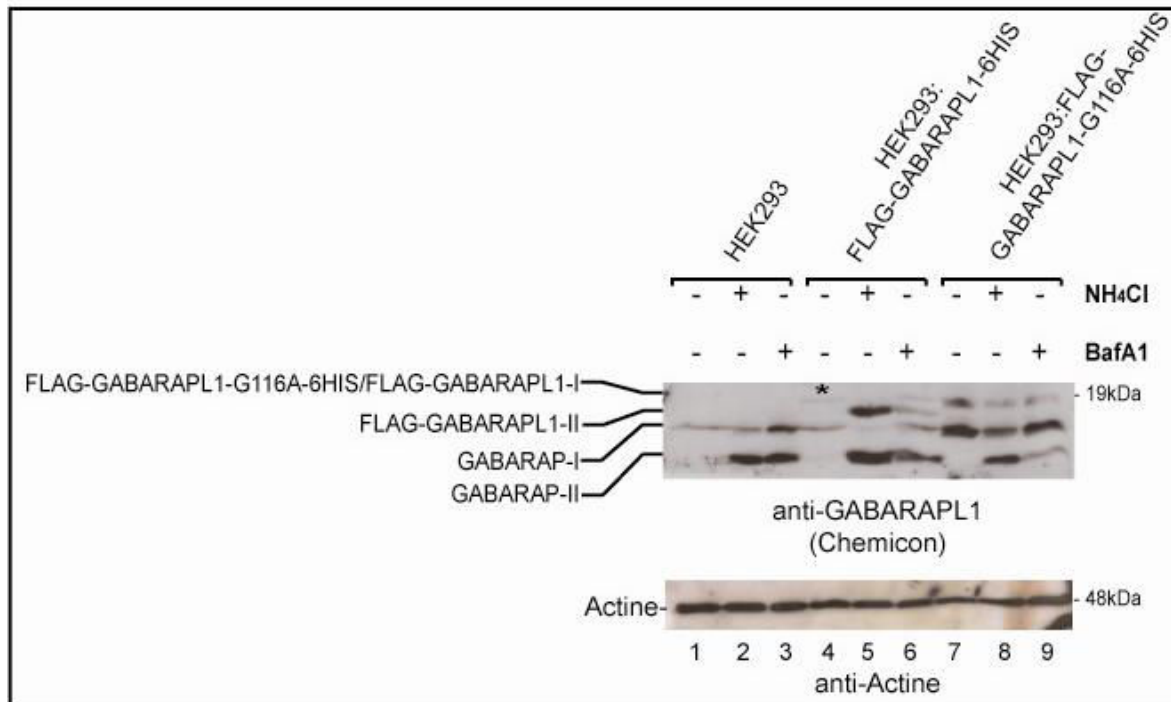


Figure 26 : Inhibition du flux autophagique dans les cellules HEK293, HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS et HEK293:FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS. Les cellules ont été incubées avec 50 mM NH₄Cl pendant 2 h ou avec 500 nM BafA1 pendant 16 h. Les cellules ont été lysées et les extraits protéiques totaux ont été chargés sur un gel 15 %. La révélation a été effectuée avec des anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 et GABARAP (Chemicon, 1/1000^e), Actine (1/3000^e) et le kit de bioluminescence ECL Plus. (*) : signal correspondant à la protéine GABARAPL1 à 19 kDa.

Dans les cellules non induites HEK293:FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS (piste 7), deux signaux sont observés. Le premier signal d'une taille de 19 kDa (*, piste 4) correspond à la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS surexprimée et le deuxième migrant plus loin correspond à la protéine GABARAP-I.

En revanche, lorsque les cellules ont été incubées avec les inhibiteurs du flux autophagique, nous avons observé des différences dans l'accumulation des formes liées aux phospholipides (-II) des protéines de la sous-famille GABARAP.

Dans les cellules HEK293 incubées avec le NH₄Cl ou la Bafilomycine A1 (pistes 2 et 3), nous observons l'apparition d'un nouveau signal de taille inférieure à celui correspondant à la protéine GABARAP. Ce signal correspond à la forme modifiée liée aux phospholipides de GABARAP, GABARAP-II. En effet, il a été décrit que la liaison à des phospholipides accélère la migration des protéines modifiées en gel SDS-PAGE.

Dans les cellules HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS incubées avec le NH₄Cl ou la Bafilomycine A1 (pistes 5 et 6), nous observons l'apparition de deux nouveaux signaux de tailles inférieures à FLAG-GABARAPL1-6HIS et GABARAP, respectivement. Ces signaux correspondent aux formes modifiées liées aux phospholipides, FLAG-GABARAPL1-II et GABARAP-II.

Dans les cellules HEK293:FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS incubées avec le NH₄Cl ou la Bafilomycine A1 (pistes 8 et 9), nous observons l'apparition d'un seul nouveau signal que nous avons déjà observé dans les cellules HEK293 sauvages. Ce signal correspond à la forme liée aux phospholipides de GABARAP, GABARAP-II. Nous n'avons pas détecté de forme liée aux phospholipides de la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS.

Ces résultats démontrent que la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS n'est pas clivée et par conséquent qu'elle n'est pas liée aux phospholipides contrairement à ce qui a été démontré pour la protéine sauvage. Ce résultat confirme que le site de clivage de la protéine GABARAPL1 est la glycine 116 et que ce résidu est nécessaire pour sa conjugaison à un phospholipide et donc pour son rôle dans l'autophagie. Ces résultats nous permettent également de valider le modèle cellulaire établi. D'autre part, nous pouvons noter que les niveaux de la protéine mutée FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS sont légèrement supérieurs à ceux observés pour la protéine sauvage FLAG-GABARAPL1-6HIS dans les cellules non stimulées. Cela pourrait suggérer que cette mutation stabiliserait la protéine dans les cellules. Il sera intéressant de déterminer si ces résultats sont reproductibles et si cette stabilité accrue est liée à une inhibition de la dégradation de la protéine par autophagie ou par le protéasome.

2)-Etablissement d'une lignée immortalisée MEF:GABARAP^{-/-}

Les souris *knockout* GABARAP^{-/-} nous ont été fournies par le Pr. Heinrich Betz (Max-Planck Institute for Brain Research, Allemagne). Elles ont été créées à partir de cellules souches embryonnaires dans lesquelles le gène *gabarap* a été inactivé par la technique du *gene trap*. Ces souris ont été produites afin d'étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de la protéine GABARAP sur son rôle dans le transport du récepteurs GABA_A (O'Sullivan *et al.*, 2005). Les résultats obtenus ont montré que ces souris GABARAP^{-/-} ne présentent aucun

phénotype les distinguant des souris sauvages. En plus de l'absence de phénotype particulier, le niveau d'expression et la localisation de la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A ne sont pas affectés par l'inhibition de la protéine GABARAP. Ces résultats suggèrent que la protéine GABARAP n'est pas essentielle au transport du récepteur GABA_A à la membrane plasmique ou qu'elle n'est pas la seule impliquée dans ce transport. Etant donné la forte homologie entre les protéines GABARAP et GABARAPL1, ainsi que la forte expression de GABARAPL1 dans le système nerveux central et son rôle dans le transport du récepteur GABA_A, il est fortement probable que la protéine GABARAPL1 se substitue à GABARAP et exerce cette fonction. Ainsi, ces résultats suggèrent que ces deux protéines peuvent être redondantes pour leur rôle dans le transport du récepteur GABA_A.

Comme décrit auparavant, l'étude de GABARAPL1 est rendue très difficile *in vivo* et dans les cellules du fait de la forte homologie des protéines de la sous-famille GABARAP. Nous avons donc décidé d'établir une lignée immortalisée MEF:GABARAP^{-/-} afin d'étudier le rôle de la protéine GABARAPL1 endogène dans un contexte biologique en absence de son homologue le plus proche, GABARAP. Cela apparaît d'autant plus nécessaire que les expériences que j'ai effectuées au laboratoire avec des shRNA ont démontré la difficulté d'inhiber l'expression d'une protéine sans altérer celle de son homologue, même en ciblant les ARNm. Nous pourrions ainsi étudier le rôle de GABARAPL1 dans différents processus biologiques et donc conclure sur la redondance éventuelle de ces deux protéines homologues.

Les fibroblastes embryonnaires MEF:GABARAP^{-/-} ont été isolés à partir des souris *knockout* pour le gène *gabapap*. Brièvement, 15 embryons ont été récupérés à J14 puis incubés dans une solution de trypsine 0,02 % pendant la nuit. Les embryons ont ensuite été homogénéisés dans du milieu DMEM complet supplémenté de 10 % de SVF puis les cellules ont été mises en culture en plaques de 10 cm de diamètre. Ces cellules ont été cultivées pendant cinq passages avant que nous n'observions une diminution de leur prolifération. Nous avons alors débuté deux protocoles d'immortalisation : un protocole d'immortalisation spontanée et un protocole basé sur l'expression de l'antigène grand T du virus SV40.

2.1)-Culture primaire

Après isolement et culture des MEF:GABARAP^{-/-} primaires à partir d'embryons de souris, nous avons effectué un génotypage de ces cellules afin de confirmer leur caractère homozygote et leur phénotype. Nous avons donc effectué une réaction PCR à partir d'ADN génomiques extraits de cellules MEF:WT (*Wild Type*) immortalisées et de cellules MEF:GABARAP^{-/-} maintenues en culture primaire et d'amorces ciblant le gène *gabapap*.

D'après la figure 27, un signal de 1500 pb correspondant à l'amplification du gène *gabapap* a été observé dans les cellules MEF:WT mais pas dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-}. Ce résultat démontre que le gène *gabapap* n'est pas présent dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-} confirmant ainsi le phénotype de ces cellules. Nous avons également effectué des réactions PCR qui permettent à la fois l'amplification du gène *gabapap* et de la séquence nucléotidique ayant été inséré à l'intérieur du gène pour inhiber son expression. Les résultats obtenus, non décrits ici, confirment ceux obtenus lors du génotypage des souris MEF:GABARAP^{-/-} avec les amorces spécifiques de *gabapap* (O'Sullivan *et al.*, 2005).

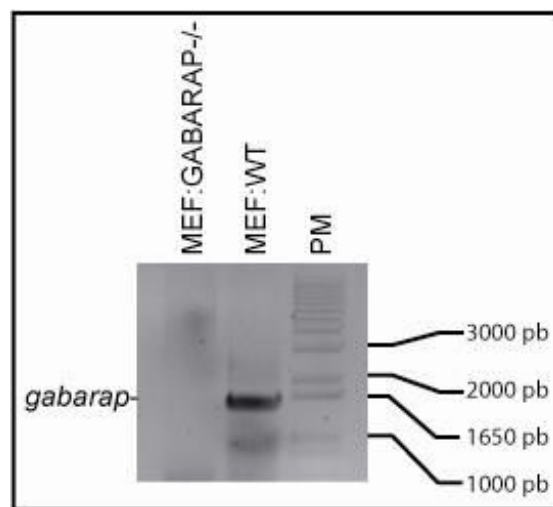


Figure 27 : Génotypage des cellules MEF:GABARAP^{-/-}. L'ADN génomique a été extrait à partir des cellules MEF:WT et MEF:GABARAP^{-/-} puis une PCR ciblant le gène *gabapap* a été effectuée avec les amorces et selon les conditions décrites dans les travaux de O'Sullivan (O'Sullivan *et al.*, 2005). Les produits de PCR ont été chargés sur un gel d'agarose 1 % puis révélés à l'aide du BET. PM : Marqueur de poids moléculaire 1kb ladder plus (Fermentas).

Nous avons ensuite vérifié l'extinction de l'expression du gène *gabapap* et de la synthèse de la protéine par western-blotting. Pour cela, les protéines totales (40 µg) de cellules MEF:GABARAP^{-/-} ou MEF:WT, au même stade de culture (1, 2 ou 3 passages), ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 15 %. La détection des protéines GABARAP et GABARAPL1 a été réalisée grâce à deux anticorps anti-GABARAPL1 différents. Le premier de ProteinTech est spécifique de GABARAPL1 alors que le deuxième de Chemicon reconnaît les deux homologues (figure 28).

Lorsque nous utilisons l'anticorps non spécifique, nous observons un seul signal pour les cellules MEF:WT de passage 1 et ce signal correspond à GABARAP (piste 1). Dans les

cellules MEF:GABARAP^{-/-}, nous observons également un seul signal de taille légèrement supérieure qui correspond à GABARAPL1 (piste 2).

Pour les passages 2 et 3, nous obtenons les mêmes résultats si ce n'est que nous visualisons maintenant les deux protéines avec l'anticorps non spécifique confirmant que ces deux signaux correspondent bien à GABARAPL1 et GABARAP (pistes 3/4 et 5/6).

Il faut souligner que le taux de GABARAPL1 est accru dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-} par rapport aux cellules sauvages (passage 1, pistes 1 et 2) mais semble diminuer au fil des passages suivants (comparer les pistes 2, 4 et 6). Au contraire, dans les cellules sauvages, alors que l'expression de GABARAPL1 n'est pas détectée dans le passage 1 (piste 1), elle apparaît aux passages suivants (pistes 3 et 5).

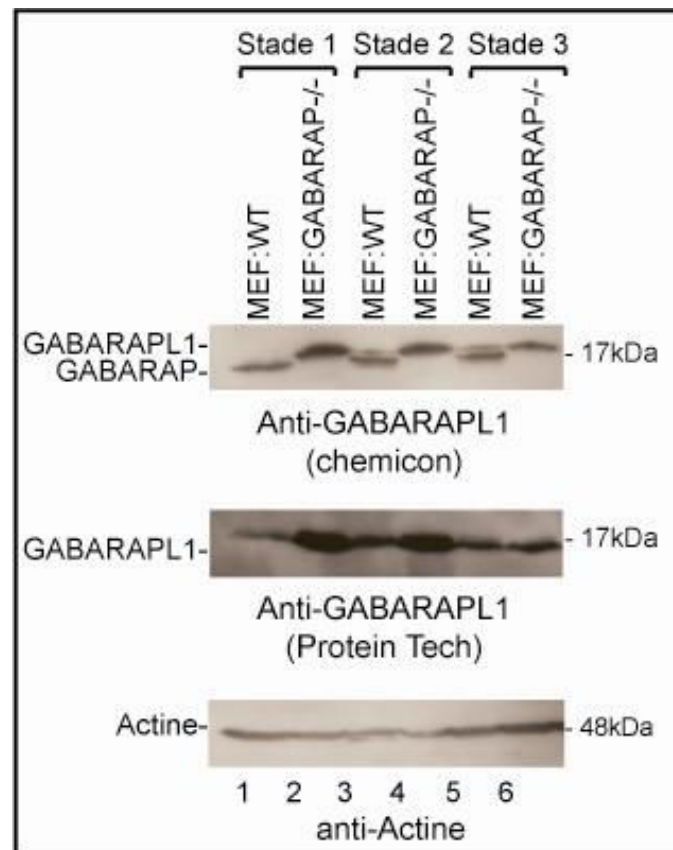


Figure 28 : Expression de GABARAPL1 au cours des différents passages de cultures primaires de cellules MEF:WT et MEF:GABARAP^{-/-}. Les protéines totales (40 µg), extraites de cellules primaires à différents passages, ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 15 %. La révélation a été effectuée avec deux anticorps dirigés contre la protéine GABARAPL1 (dilution 1/1000^e) et un anticorps dirigé contre l'Actine (dilution 1/3000^e).

Ces résultats suggèrent que l'expression de GABARAPL1 est régulée au cours de l'évolution des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de souris et que cette expression est fortement induite dans les cellules primaires qui n'expriment plus la protéine

GABARAP. Ces résultats n'avaient pas été décrits par O'Sullivan et collaborateurs qui avaient conclu que l'expression des protéines GABARAPL1 et GABARAPL2 n'était pas altérée dans les souris *gabarap* KO (O'Sullivan *et al.*, 2005).

2.2)-Immortalisation des cellules primaires MEF:GABARAP^{-/-}

Lors de la culture des cellules primaires MEF:GABARAP^{-/-}, nous avons observé une diminution de la prolifération significative après les cinq premiers passages. Afin de les maintenir en culture pour une durée indéterminée, nous avons choisi d'immortaliser les cellules MEF:GABARAP^{-/-} et pour cela deux protocoles d'immortalisation différents ont été utilisés : l'immortalisation spontanée et l'immortalisation par l'antigène grand T du virus SV40 (Figure 29).

L'immortalisation spontanée consiste en une série de passages des cellules jusqu'à restauration de leur capacité à proliférer. Deux critères sont requis pour l'immortalisation spontanée : l'apparition de mutations activant des oncogènes et les rendant constitutivement actifs et l'activation de l'activité télomérasique, importante pour le maintien de la longueur des télomères au cours des divisions. Pour ce protocole, 30 flasques de 25 cm² contenant 300 000 cellules ont été mises en cultures puis des sous-cultures ont été réalisées tous les trois jours avec la même densité cellulaire. Après 27 passages, nous avons isolé 60 clones à partir des deux boîtes encore en culture. A ce stade, seulement la moitié des clones ont survécu et à partir du stade 33, la quasi-totalité des clones sont morts. Deux semaines plus tard, des cellules ont proliféré et ont formé de nouveaux clones qui ont été récolté et remis en culture.

L'immortalisation par l'antigène grand T du virus SV40 a consisté en la transfection des cellules MEF:GABARAP^{-/-} par un vecteur d'expression de l'antigène grand T du virus SV40. L'antigène T a la capacité de d'inhiber les protéines Rb et p53 ce qui l'entrée en phase S des cellules surexprimant l'antigène T. Ces cellules présentent donc une durée de vie plus importante que les cellules primaires. Au laboratoire, une lignée d'endomètre de cobaye immortalisée a déjà été établie (Nemos *et al.*, 2004) et nous avons donc utilisé le même protocole d'immortalisation. Les cellules ont été transfectées par le vecteur d'expression du grand T de SV40 puis les clones résistants ont été repris et cultivés. A partir du passage 20, les cellules ont atteint une phase de crise qui est décrite comme une crise cellulaire qui est associée à la réactivation de la télomérase. Seules les cellules qui échappent à cette crise sont considérées comme immortalisées. Actuellement, nos clones ont dépassé la crise et sont en culture dans l'attente de la prolifération de cellules résistantes qui seront ensuite considérées comme immortalisées.

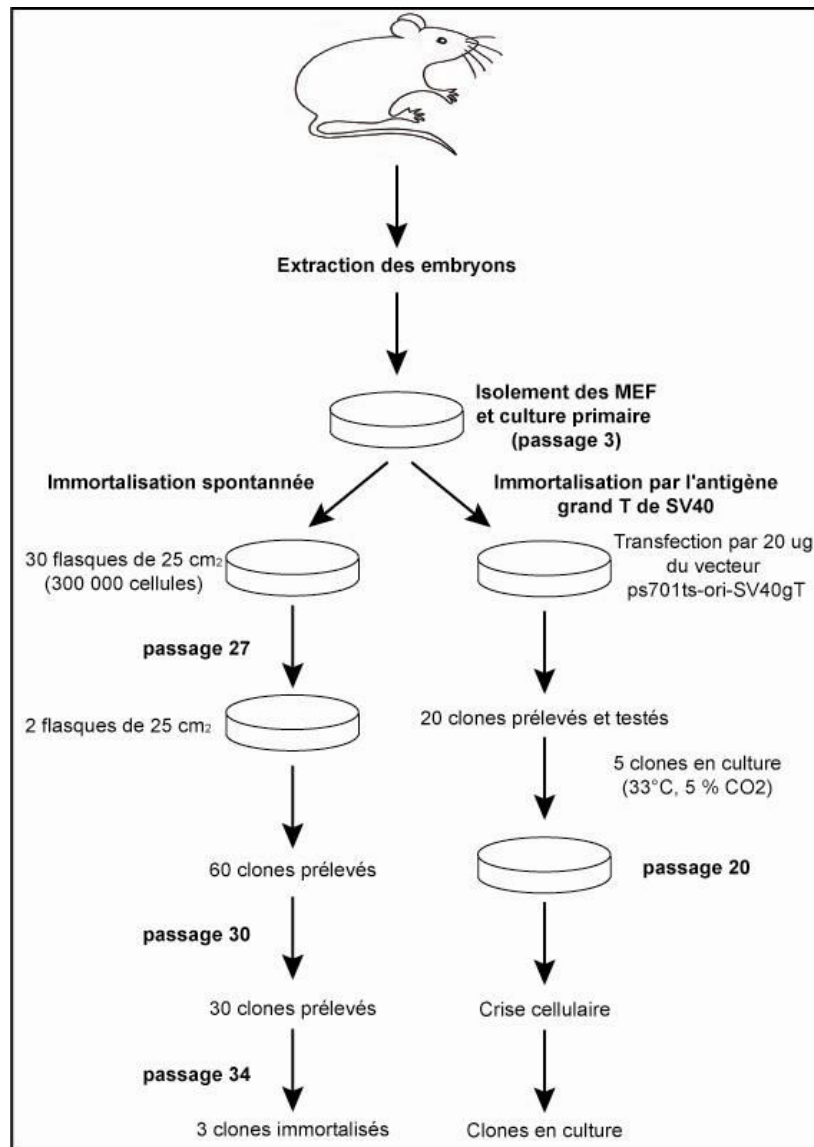


Figure 29 : Schéma récapitulatif des deux protocoles d'immortalisation.

A la suite de ces deux protocoles, nous avons analysé l'expression de la protéine GABARAPL1 dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-} immortalisées spontanément et dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-} en cours d'immortalisation par l'antigène grand T du virus SV40. Nous avons utilisé comme contrôles positifs de l'immortalisation par l'antigène grand T, les cellules MEF:WT et MEF:Atg5^{-/-}. Pour cela, 40 µg de protéines totales extraites à partir de cellules MEF:WT immortalisées, MEF:Atg5^{-/-} immortalisées, MEF:GABARAP^{-/-} primaires, MEF:GABARAP^{-/-} immortalisées spontanément et MEF:GABARAP^{-/-} immortalisées par le grand T de SV40 ont été chargés sur un gel 15 %. La détection des protéines GABARAPL1 et grand T de SV40 a été effectuée grâce à des anticorps spécifiques (Figure 30).

Comme le montre la figure 30, la protéine GABARAPL1 est exprimée à un niveau comparable dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-} immortalisées spontanément,

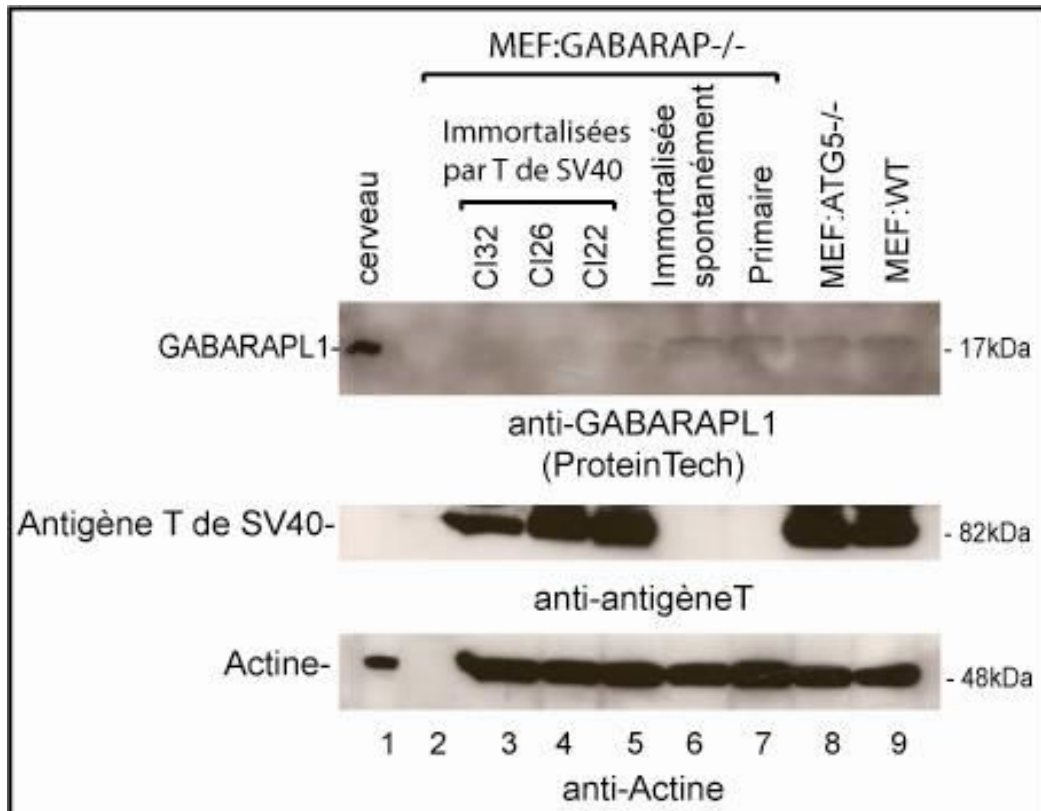


Figure 30 : Expression de GABARAPL1 dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-} primaires, immortalisées spontanément et en cours d’immortalisation par le grand T de SV40. Les protéines totales (40 µg) extraites de cellules MEF:WT, MEF:Atg5^{-/-}, MEF:GABARAP^{-/-} primaires, immortalisées spontanément et en cours d’immortalisation par le grand T de SV40 ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 15 %. La révélation a été effectuée avec les anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 (dilution 1/1000^e), Actine (dilution 1/3000^e) et antigène grand T (1/2000^e) et le kit de bioluminescence ECL Plus.

MEF:GABARAP^{-/-} primaires (stade 4), MEF:Atg5^{-/-} immortalisées et MEF:WT immortalisées (pistes 6 à 9). Par contre, la protéine GABARAPL1 est plus faiblement exprimée dans les 3 clones en cours d’immortalisation par le grand T de SV40 (pistes 3 à 5). Par ailleurs, nous avons bien confirmé l’expression de l’antigène grand T de SV40 dans les cellules MEF:WT, MEF:Atg5^{-/-} et dans les clones 22, 26 et 32 (pistes 2, 3, 4, 8 et 9). Ce résultat démontre pour la première fois que l’expression de la protéine GABARAPL1 est régulée négativement dans les cellules transfectées par le grand T de SV40. Il sera donc intéressant d’étudier l’expression de GABARAPL1 dans les mêmes cellules après leur immortalisation afin de déterminer si l’expression de GABARAPL1 varie au cours des stades d’immortalisation par l’antigène grand T de SV40 dans les cellules n’exprimant pas la protéine GABARAP par rapport aux cellules immortalisées sauvages (MEF:WT).

3)-Etablissement des lignées MCF-7 et HEK293:DsRed-GABARAPL1

Au cours de ce travail, j'ai établi deux lignées cellulaires HEK293 et MCF-7 qui surexpriment la protéine de fusion DsRed-GABARAPL1. Ces deux lignées ont été utilisées pour l'étude de la localisation intracellulaire de la protéine GABARAPL1. Ces expériences ont montré que GABARAPL1 est localisée dans des vésicules intracellulaires marquées avec un colorant des lysosomes, le LysoTracker green. De plus, des expériences de transfection transitoire de cellules HEK et MCF-7:DsRed-GABARAPL1 par un vecteur codant la protéine GFP-LC3 ont montré que les deux protéines DsRed-GABARAPL1 et GFP-LC3 co-localisent dans des vésicules intracytoplasmiques après inhibition du flux autophagique (Chakrama *et al.*, 2010).

D'autre part, cette lignée a été utilisée pour un autre projet, initié et effectué au laboratoire par Stéphanie Seguin-Py au cours de sa thèse, qui consistait en la recherche de nouveaux partenaires de GABARAPL1. Les résultats obtenus ont montré, par GST-pull down couplée à la spectrométrie de masse, que GABARAPL1 interagit avec la protéine HSP90 β (*Heat Shock Protein 90 β*). Cette interaction a ensuite été confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation et de co-localisation *in vitro* et *in vivo*. Il a également été montré que HSP90 α/β est une protéine chaperonne de la protéine GABARAPL1 et que l'inhibition de l'interaction de ces deux protéines induit la dégradation de GABARAPL1 par le protéasome.

La lignée MCF-7:DsRed-GABARAPL1 que j'ai créée a été utilisée pour l'étude de la co-localisation intracellulaire de GABARAPL1 avec son nouveau partenaire HSP90 α/β .

Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication suivante placée en annexe :

« Identification of HSP90 α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein »

Stéphanie Seguin-Py, Géraldine Lucchi, Sophie Croizier, Fatima Z. Chakrama, Gilles Despouy, Jaclyn N. Le Grand, Patrick Ducoroy, Wilfrid Boireau, Michaël Boyer-Guittaut, Michèle Jouvenot, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux.

Discussion Générale

1)-Caractérisation du rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie.

1.1)-GABARAPL1 et mécanisme de l'autophagie

La première partie de mon travail a consisté en l'étude du rôle de la protéine GABARAPL1 au cours du processus de l'autophagie. Comme cela a été décrit tout au long de ce manuscrit, la protéine GABARAPL1 appartient à la sous-famille des protéines GABARAP, elle-même faisant partie de la grande famille des protéines Atg8. Par ailleurs, toutes les protéines de la famille Atg8 possèdent un résidu très conservé en position C-terminale, la glycine 116, qui a été démontré pour jouer un rôle important au cours du processus autophagique (Figure 4). En effet, ces protéines sont initialement clivées en C-terminal par une cystéine protéase de la famille Atg4 pour exposer le résidu glycine à la fin de la séquence protéique. Ce résidu est ensuite utilisé pour la conjugaison de ces protéines à un phospholipide au cours de l'autophagie. Ces protéines, liées de manière covalente à un phospholipide, sont alors relocalisées à la membrane du phagophore et permettent l'élongation de ce dernier jusqu'à formation complète de l'autophagosome. Ce processus de conjugaison a été démontré pour tous les membres de la famille LC3 excepté pour la protéine GABARAPL1.

Du fait de la forte identité de séquence de la protéine GABARAPL1 avec les membres de la famille Atg8 et de la conservation de la glycine 116 dans la séquence de GABARAPL1, nous avons entrepris l'étude du rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie. Au cours de ce travail, décrit dans la publication « *GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles* », nous avons montré que la protéine est clivée, dès sa synthèse, au niveau du résidu glycine 116 et que cette maturation est nécessaire pour la conjugaison de la protéine aux phospholipides (Figure 26). Nous avons ensuite montré que la protéine GABARAPL1 peut être localisée dans les autophagosomes (co-localisation avec LC3) ou dans les lysosomes (marquage par le LysoTracker green). Nous avons enfin montré que cette localisation dépend de l'expression d'Atg5, une protéine essentielle de l'autophagie.

Ces résultats démontrent pour la première fois que GABARAPL1 est associée à des vésicules autophagiques.

Le clivage de la protéine GABARAPL1 a également été démontré par deux autres équipes. Betin et collaborateurs ont montré que GABARAPL1 est clivée *in vitro* par la protéine Atg4B et par la protéine Atg4D maturée (Betin & Lane, 2009). Chen et collaborateurs ont montré, quant à eux, que GABARAPL1 est clivée dans les cellules et que

ce clivage n'est pas nécessaire pour le rôle de GABARAPL1 au cours du transport du récepteur des κ opioïdes (Chen *et al.*, 2011).

Au cours de cette étude, nous avons également montré, lors d'expériences de co-localisation effectuées avec les protéines DsRed-GABARAPL1 et GFP-LC3, que certaines vésicules sont marquées pour LC3 (en vert), pour GABARAPL1 (en rouge) ou pour les deux (en jaune) (Chakrama *et al.*, 2010). Ces expériences posent la question de la composition relative des vésicules autophagiques en protéines de la famille Atg8. Il sera donc intéressant à l'avenir de déterminer si toutes les vésicules comportent les différents membres de la famille Atg8 au niveau de leur membrane ou s'il existe une certaine spécificité de la présence de ces protéines selon les vésicules. Il sera notamment intéressant de déterminer si cette spécificité peut être liée au type cellulaire ou au stress cellulaire. Une réponse partielle est parvenue des travaux de Weidberg et collaborateurs qui ont montré que la protéine LC3 est impliquée dans les stades précoces de la formation des autophagosomes, même si elle reste associée à la membrane de l'autophagosome jusqu'à leur fusion avec les lysosomes, alors que les protéines de la sous-famille GABARAP interviennent lors des stades tardifs de la formation des autophagosomes et spécialement lors de la fermeture de ces derniers (Weidberg *et al.*, 2010). Si nous nous basons sur cette étude, les vésicules GFP-LC3 positives (vertes) correspondraient donc à des autophagosomes précoces alors que celles marquées par les deux protéines (jaunes) représenteraient des autophagosomes tardifs. Quant aux vésicules rouges (DsRed-GABARAPL1 positives), elles pourraient correspondre à des autophagolysosomes puisqu'il a été démontré que la protéine GFP est plus rapidement inactivée dans un contexte acide que la protéine DsRed (Katayama *et al.*, 2008). Les deux protéines seraient donc présentes dans ces vésicules mais seule la protéine DsRed serait toujours fluorescente.

Cependant, l'étude de Weidberg et collaborateurs n'a pas abordé la question du rôle relatif des protéines de la sous-famille GABARAP. En effet, les auteurs ont utilisé un pool de siRNA dirigés contre les trois gènes de la sous-famille. Cette étude a été poursuivie par le même laboratoire qui a montré que LC3 et GABARAPL2 sont impliquées dans l'étirement et l'hémifusion de la membrane (Weidberg *et al.*, 2011). Le rôle de ces deux protéines dans la fusion membranaire nécessite les acides aminés N-terminaux formant la première hélice α de la protéine. Les auteurs ont également montré que la fusion membranaire médiée par LC3 implique des interactions ioniques alors que celle induite par GABARAPL2 implique des interactions hydrophobes. Les auteurs suggèrent ainsi que l'élongation des phagophores pourrait être médiée uniquement par la protéine LC3 alors que GABARAPL2 serait importante pour la fermeture des autophagosomes. Cependant, GABARAPL2 ne semble pas

agir seule et nécessiterait l'intervention d'autres protéines telles que les protéines de la machinerie SNARE (Weidberg *et al.*, 2011).

1.2)-GABARAPL1 et autophagie sélective

Le rôle de GABARAPL1 pourrait donc ne pas être lié à l'élongation ou la maturation des autophagosomes mais plutôt à la spécificité du mécanisme de l'autophagie. En effet, l'autophagie a été initialement décrite comme étant un processus non spécifique mais de récentes études ont montré que, dans certaines conditions, l'autophagie est spécifique vis-à-vis de certains substrats dégradés (protéines ou organites). Cette spécificité est liée à la présence d'adaptateurs qui font le lien entre les cargos (matériel à dégrader) et les protéines de la famille Atg8 localisées à la surface de l'autophagosome. Les cargos décrits à l'heure actuelle sont les protéines p62, NBR1 et Nix. Ces protéines interagissent avec les cargos, généralement ubiquitinylés, grâce à leur domaine UBA et avec les protéines de la famille Atg8 grâce à leur domaine LIR.

Récemment, il a été démontré que les protéines de la sous-famille GABARAP interagissent avec les protéines p62 et NBR1 (Kirkin *et al.*, 2009; Pankiv *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'interaction de GABARAPL1 avec p62 facilite la dégradation d'agrégats de protéines ubiquitinylées (Pankiv *et al.*, 2007). Une autre étude a également démontré l'implication de GABARAPL1 dans l'autophagie sélective *via* son interaction avec une autre protéine adaptatrice, Nix, une protéine localisée à la membrane externe de la mitochondrie. Ce cargo lie préférentiellement GABARAPL1 par rapport aux autres membres de la sous-famille GABARAP. L'interaction de Nix avec GABARAPL1 permet la dégradation sélective des mitochondries endommagées par autophagie lors de la différenciation des réticulocytes (Novak *et al.*, 2010).

Il sera nécessaire de déterminer s'il existe d'autres adaptateurs encore non décrits à ce jour interagissant spécifiquement avec GABARAPL1. L'une des approches pourrait être de focaliser les futures recherches sur les lignées cellulaires ou les tissus présentant une forte expression de GABARAPL1 et en particulier le système nerveux central. Une étude a par exemple montré que GABARAPL1 interagit préférentiellement *in vitro* avec les oligomères d' α -synucléine par rapport à la protéine seule. Cette protéine jouant un rôle essentiel au cours de la mort neuronale observée dans plusieurs maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer) (Schnack *et al.*, 2008), il sera intéressant de déterminer si cette interaction peut activer spécifiquement la dégradation par autophagie de ces oligomères *via* leur interaction directe avec GABARAPL1 dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Nos données et celles de la littérature permettent de proposer un schéma du rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie (Figure 31).

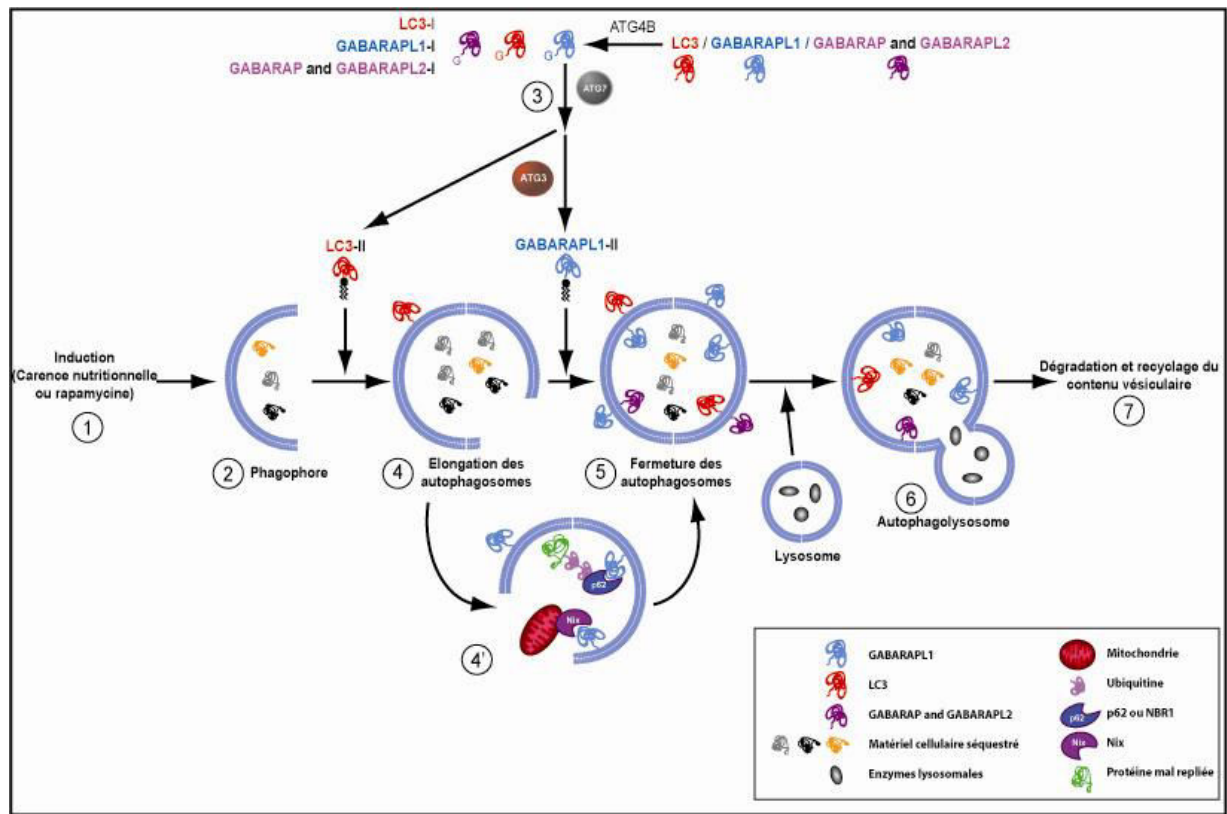


Figure 31 : Rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie. 1 : Induction de l'autophagie. 2 : Formation des phagophores. 3 : Clivage des protéines de la famille Atg8 par la protéine Atg4B puis elles sont conjuguées à un phospholipide. La protéine LC3-II participe à l'élongation des phagophores. 4 : GABARAPL1-II lie la protéine p62 et Nix et participe ainsi à l'autophagie sélective et à la mitophagie. 5 : GABARAPL1-II participe à la fermeture des autophagosomes. 6 : Maturación des autophagosome. 7 : Dégradation du contenu vésiculaire. Modifié d'après Le grand, Chakrama *et al.*, 2011.

1.3)-GABARAPL1, autophagie et prolifération cellulaire

Au laboratoire, l'effet de la surexpression de la protéine GABARAPL1 sur la prolifération de deux lignées cellulaires différentes (MCF-7 et HEK293) a été étudié. La surexpression de la protéine GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 conduit à l'inhibition de leur prolifération. Par contre, sa surexpression dans les cellules HEK293 active leur prolifération. GABARAPL1 semble donc avoir un rôle différent au cours de la prolifération cellulaire en fonction de l'origine des cellules étudiées mais le mécanisme par lequel GABARAPL1 régule la prolifération reste encore inconnu à ce jour.

Etant donné ces résultats contradictoires obtenus sur deux lignées cellulaires, et afin de mieux caractériser le rôle de GABARAPL1 au cours de la prolifération cellulaire, cette étude

devra être poursuivie sur d'autres lignées cellulaires de cancer du sein ou d'origine neuronale. Actuellement, nous disposons au laboratoire de la lignée MDA-MB231 qui surexprime la protéine GABARAPL1. Cette lignée, dérivée de cancer du sein, est très agressive et présente un potentiel invasif supérieur à celui des MCF-7. Cette lignée est en cours de caractérisation. Par ailleurs, nous disposons également de la lignée SH-SY5Y, dérivée de neuroblastome humain, qui permettra de créer un modèle d'étude neuronal surexprimant la protéine GABARAPL1. L'effet de la surexpression de GABARAPL1 dans cette lignée sera ensuite comparé à celui observé pour la lignée HEK293.

Afin de déterminer si cette régulation de la prolifération est liée à son rôle dans l'autophagie, nous avons créé une lignée HEK293 qui surexprime la protéine mutée FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS, dont le résidu glycine 116 est muté par une alanine. Comme le montre la figure 26, dans ces cellules, la protéine GABARAPL1 n'est pas clivée au niveau du résidu glycine et par conséquent ne peut être conjuguée à un phospholipide et donc ne peut pas être impliquée dans la formation des autophagosomes. Des expériences (tests MTT) sont actuellement en cours afin de déterminer si cette mutation a un effet sur la prolifération des cellules. Si aucun effet n'est observé, il sera intéressant de placer ces cellules en conditions de stress inducteur de l'autophagie pour évaluer leur réponse par rapport aux cellules sauvages. Il sera également nécessaire de confirmer ces résultats dans d'autres lignées cellulaires telles que les lignées MDA-MB231, MCF-7 et SH-SY5Y surexprimant la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS.

1.4)-GABARAPL1, autophagie et tumorigenèse

L'autophagie a été décrite pour jouer un rôle important au cours de la tumorigenèse et la progression tumorale. En effet, de nombreuses études ont démontré le rôle double et paradoxal de l'autophagie dans les cancers. L'autophagie peut agir comme un mécanisme suppresseur de tumeur mais permet également la survie des cellules cancéreuses en conditions de stress (Roy & Debnath, 2010). Il est notamment maintenant admis que l'autophagie empêche la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses *via* son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Mathew & White, 2007). L'autophagie dégrade les constituants cellulaires qui représentent une source potentielle de stress cytotoxique ou génotoxique qui sont responsables de l'initiation de la tumorigenèse. Ainsi, le caractère suppresseur de tumeurs de l'autophagie a été mis en évidence par la découverte et la caractérisation de gènes de l'autophagie tels que *beclin1*. L'expression de la protéine Beclin1 est inhibée dans plusieurs lignées et tissus cancéreux et notamment dans les cancers du sein.

Par ailleurs, la délétion monoallélique du gène *beclin1* est retrouvée dans plusieurs cancers tels que le cancer du sein, de la prostate et des ovaires (Aita *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1999). De plus, l'haploinsuffisance du gène *beclin1* chez la souris conduit au développement de plusieurs tumeurs comme des lymphomes, des cancers du poumon et du foie. La réintroduction de Beclin1 dans des cellules tumorales diminue leur capacité à former des colonies sur agar mou et à former des tumeurs dans des souris *nude*. *Beclin1* a donc été proposé comme un nouveau gène suppresseur de tumeur (Liang *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'autophagie sélective est également impliquée dans la tumorigenèse. En effet, une accumulation de la protéine p62 due à l'inhibition de l'autophagie induit la tumorigenèse (Dikic *et al.*, 2010). L'accumulation de p62 dans les cellules est liée à plusieurs dommages de l'ADN dus à la production excessive de ROS par des mitochondries endommagées. D'autres études ont rapporté que l'inhibition de la dégradation de p62 par l'autophagie affecte des voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse telles que les voies de signalisation NFκB et ERK (Dikic *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2008).

En revanche, pendant les stades tardifs de la formation des tumeurs, l'autophagie joue un rôle dans le maintien de la survie de ces cellules. En effet, l'autophagie permet la survie des cellules tumorales en conditions d'hypoxie et de carence nutritionnelle avant l'angiogenèse. L'autophagie protège également les cellules de l'anoïkis et de l'apoptose induite après le détachement des cellules tumorales de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi leur survie et donc la progression tumorale (Roy & Debnath, 2010).

Comme la protéine Beclin1, GABARAPL1 participe à l'autophagie, est très faiblement exprimée dans les lignées et tissus de cancer du sein et sa surexpression diminue la capacité des cellules MCF-7 à former des colonies sur agar mou. Au vu des résultats obtenus pour Beclin1, le rôle de GABARAPL1 dans le cancer du sein pourrait s'expliquer par son rôle dans l'autophagie. En effet, Nix, une protéine pro-apoptotique lie préférentiellement GABARAPL1 et induit la mitophagie afin de limiter la production de ROS responsables de plusieurs dommages à l'ADN ainsi que d'instabilités génomiques qui induisent la tumorigenèse (Novak *et al.*, 2010). Récemment, l'autophagie sélective a été décrite comme un processus suppresseur de tumeur et il est donc possible que GABARAPL1 participe à l'inhibition de l'initiation de la tumorigenèse *via* son rôle dans l'autophagie sélective et particulièrement dans la mitophagie.

Récemment, il a été rapporté que l'autophagie joue un rôle dans la transformation des cellules par plusieurs oncogènes tels que l'oncogène Ras. De nombreuses mutations génétiques, retrouvées dans 30 à 60 % des cancers humains, conduisent à la production des

formes constitutivement actives de l'oncoprotéine Ras. L'autophagie a été décrite comme un mécanisme favorisant la transformation des cellules de cancer du sein et des fibroblastes embryonnaires de souris induite par l'oncogène Ras (Lock *et al.*, 2011). En effet, l'autophagie facilite le métabolisme glucidique des cellules en cours de transformation et cet effet est inhibé lors de l'extinction des gènes *atg5* et *atg7*. Ces résultats suggèrent donc que l'autophagie est nécessaire à la prolifération des cellules lors de la transformation par l'oncogène Ras (Lock *et al.*, 2011). Paradoxalement, une étude très récente a montré que l'oncogène Ras induit la surexpression des protéines Beclin1 et Noxa, une protéine qui lie les protéines de la famille Bcl-2 et diminue leur affinité pour Beclin1. Cette surexpression provoque la mort par autophagie des cellules en cours de transformation et inhibe donc l'effet oncogénique de Ras (Elgendy *et al.*, 2011).

Actuellement, nous disposons au laboratoire de plusieurs lignées MEF sauvage et MEF:GABARAP^{-/-} immortalisées de manière spontanée ou par expression de l'antigène grand T du virus SV40. Les lignées MEF sauvage et MEF:GABARAP^{-/-} seront tout d'abord transfectées de manière stable par un vecteur exprimant des shRNA dirigés contre l'ARNm *gabarapl1* afin d'obtenir des lignées MEF n'exprimant plus les protéines GABARAP et GABARAPL1. Ces lignées seront ensuite transformées par l'oncogène Ras muté. Il sera alors possible d'évaluer l'expression de la protéine GABARAPL1 au cours de la transformation puis l'efficacité de transformation de ces cellules en l'absence d'une ou des deux protéines homologues. L'efficacité de transformation par l'oncogène Ras sera comparée à celle observée dans les cellules sauvages, les cellules GABARAP^{-/-} et les cellules Atg5^{-/-}. Ces expériences permettront de déterminer si GABARAPL1 joue un rôle au cours de la transformation induite par Ras mais également de conclure sur le rôle relatif des deux homologues au cours de ce processus.

2)-Régulation de l'expression de la protéine GABARAPL1

2.1)-Dans des lignées primaires de fibroblastes embryonnaires (MEF) sauvages ou *gabarap* KO

Suite à l'obtention de la lignée de souris KO pour *gabarap*, nous avons mis en culture des cellules primaires embryonnaires à partir desquelles nous avons établi une lignée immortalisée MEF:GABARAP^{-/-} afin d'étudier l'expression de la protéine GABARAPL1 dans des cellules n'exprimant plus la protéine homologue GABARAP.

- Expression de GABARAPL1 lors du vieillissement des populations cellulaires

Nous avons montré, lors de tests préliminaires, que l'expression de la protéine GABARAPL1 varie au cours des trois premiers passages des cellules primaires (Figure 28). En effet, son expression est augmentée pendant les trois premiers stades de culture des cellules MEF:WT alors qu'elle est diminuée dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-}. Ces expériences devront être répétées à partir de cellules obtenues à un nombre de passages plus importants afin de confirmer ces résultats.

Dans la littérature, il a été montré que l'expression du gène *gabarapl1* est augmentée lors de la sénescence induite par la répression de l'expression de la protéine E7 du papillomavirus humain dans des cellules HeLa (Johung *et al.*, 2007). En effet, il a été décrit que cette induction de la sénescence nécessite la protéine Rb et induit l'activation de 224 gènes et la répression de 354 autres gènes. Ces changements transcriptionnels observés au cours d'une sénescence induite se retrouvent largement au cours d'une sénescence répllicative observée dans des fibroblastes primaires de passages tardifs ou dans des cellules HeLa sénescents. Parmi les gènes induits au cours de ces deux processus de sénescence, on retrouve le gène *gabarapl1*. Ce gène est augmenté d'un facteur 2,1 après l'induction de la sénescence et d'un facteur 7,2 dans des fibroblastes sénescents (passage 26) par rapport aux niveaux observés dans des fibroblastes prolifératifs (passage 8). Il est à noter également que de nombreux gènes (45 avec un facteur supérieur à 3) impliqués dans la voie de dégradation lysosomale sont augmentés au cours de la sénescence induite, suggérant l'importance des voies de dégradation au cours de ces processus. Une régulation semblable a également été mise en évidence pour le gène *gabarapl1* lors du passage de neurones à GnRH d'un stade prolifératif à un stade de différenciation (l'expression du gène est augmentée d'un facteur 5 dans les cellules en différenciation) (Mansuy *et al.*, 2011). Il est à noter qu'aucune différence d'expression des gènes des autres membres de la famille *atg8* n'a été détectée au cours de ces différentes expériences.

Il sera donc intéressant de déterminer si les variations de niveaux de GABARAPL1 observées au cours des différents passages des cultures primaires sont liées à la régulation de la sénescence dans ces cellules primaires. D'autre part, il faudra déterminer si la différence d'expression de GABARAPL1 dans les cellules WT et GABARAP^{-/-} régule cet effet et si ces variations sont liées à une régulation du taux d'autophagie dans ces cellules. En effet, il a été montré que l'autophagie joue un rôle important lors de la sénescence induite par les oncogènes. L'autophagie facilite notamment l'entrée des cellules en sénescence en fournissant

des éléments de dégradation nécessaires à la synthèse des effecteurs de ce mécanisme (Narita & Young, 2009).

- Expression de GABARAPL1 en absence de son homologue GABARAP

Lors de l'établissement de la lignée immortalisée, nous avons observé une surexpression de la protéine GABARAPL1 dans les cellules MEF:GABARAP^{-/-}. Ces résultats, s'ils sont confirmés, démontreront pour la première fois une régulation croisée de l'expression des deux homologues GABARAP et GABARAPL1. Il restera maintenant à déterminer le processus régulant cette augmentation des niveaux de la protéine GABARAPL1. Est-ce une régulation génique, transcriptionnelle, post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle ? Nous devons tout d'abord déterminer si cette augmentation des taux de GABARAPL1 est liée à une augmentation de la transcription du gène dans ces cellules KO. Si cette régulation ne s'effectue pas au niveau transcriptionnel et puisque nous avons montré que la protéine interagit avec la protéine chaperone HSP90 et qu'elle est dégradée par le protéasome (Seguin-Py *et al.*, 2011, article soumis placé en annexe), il sera intéressant de déterminer si cette augmentation est due à une régulation de la stabilité de la protéine en absence de son homologue GABARAP. Pour cela, des cellules primaires WT et KO seront incubées avec des inhibiteurs de l'activité de HSP90 et/ou des inhibiteurs du protéasome afin de déterminer si l'augmentation des niveaux de GABARAPL1 dans les cellules KO est liée à son interaction avec la protéine HSP90.

Par ailleurs, on peut se demander si, de la même manière, l'extinction de l'expression de la protéine GABARAPL1 aurait un effet sur l'expression de GABARAP. Pour répondre à cette question, il sera nécessaire de créer une lignée de souris *gabarapl1 knockout*. Ce projet est en cours et sera réalisé à partir de cellules souches embryonnaires KO pour le gène *gabarapl1* déjà disponibles (EuMMCR, European Mouse Mutant Cell Repository). Ce projet sera réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dr. Zhang de l'Université d'Alabama. En attendant, l'obtention de cette lignée de souris KO, des expériences d'extinction de l'expression de la protéine GABARAPL1 par la technique des shRNA seront réalisées puis l'expression de la protéine GABARAP sera analysée dans ces lignées stables. Il sera ainsi possible de déterminer si l'inhibition de l'expression de GABARAPL1 est compensée par une surexpression de la protéine GABARAP.

Ces résultats démontrent pour la première fois une régulation de la protéine GABARAPL1 au cours du vieillissement d'une population de fibroblastes primaires

mais surtout démontrent une régulation de la protéine GABARAPL1 induite par l'absence de son homologue GABARAP.

2.2)-Dans les lignées cellulaires

Afin de compléter les études précédentes effectuées dans plusieurs laboratoires sur l'étude de l'expression du messenger *gabapap11* dans différents tissus, une étude de l'expression de GABARAPL1 dans différentes lignées cellulaires (primaires, transformées et cancéreuses) a été entreprise. Les résultats obtenus ont montré que la protéine GABARAPL1 est faiblement exprimée dans les lignées cancéreuses et particulièrement dans des lignées provenant de patients atteints de leucémies et de cancer du sein par rapport à l'expression de GABARAPL1 observée dans le cerveau de rat. Par ailleurs, nous avons également analysé le profil d'expression des protéines GABARAP et LC3 et des différences notables ont été mises en évidence. La protéine LC3 présente un profil d'expression proche de celui de la protéine GABARAPL1 alors que GABARAP est fortement exprimée dans tous les types cellulaires. Par exemple, GABARAP est fortement exprimée dans les lignées cellulaires cancéreuses par rapport à la protéine GABARAPL1. Néanmoins, ces résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence un profil d'expression spécifique d'un organe particulier étant donné le nombre restreint des lignées étudiées pour chaque catégorie (cellules primaires, transformées et cancéreuses). En revanche, ces résultats nous ont permis de mettre en évidence des profils d'expression différents des protéines de la même famille, suggérant ainsi une régulation tissulaire différente de ces protéines. Il restera à déterminer à quel niveau de l'expression du gène intervient cette régulation.

Dans notre laboratoire, une étude préliminaire réalisée par Stéphanie Seguin-Py a permis d'évaluer le niveau d'expression des ARN messagers *gabapap* et *gabapap11* par PCR quantitative en temps réel dans différentes lignées du cancer du sein (MCF-7, MDA-MB 231 et MDA-MB436) (Seguin-Py, 2011). Les résultats de cette étude ont montré que le gène *gabapap11* est moins exprimé dans ces cellules par rapport à son homologue *gabapap*. Ces résultats pourraient expliquer en partie la différence d'expression des protéines GABARAP et GABARAPL1 observée dans les lignées de cancers du sein.

2.3)-Dans les tumeurs

Afin de compléter l'étude de l'expression de GABARAPL1 dans les lignées cancéreuses, l'expression de cette protéine a été également étudiée dans des tissus tumoraux provenant de cancer du sein et de méningiomes. Des études antérieures effectuées au

laboratoire ont montré que le messenger *gabap11* est faiblement exprimé dans de nombreux cancers (vessie, rein, prostate, sein...) par rapport aux tissus sains (Berthier *et al.*, 2010). Au vu de ces données, nous avons choisi de continuer cette étude au niveau de l'expression de la protéine dans différentes tumeurs. Nous avons choisi les méningiomes afin de poursuivre l'étude débutée au laboratoire par Fabrice Tolle au niveau de l'ARNm et les cancers du sein pour poursuivre l'étude qui a montré qu'une forte expression de *gabap11* peut être considérée comme un facteur de bon pronostic (Berthier *et al.*, 2010).

L'étude de l'expression de GABARAPL1 dans les cancers du sein a été effectuée sur un nombre très restreint d'échantillons fournis par le CGFL de Dijon représentant quatre sous-types différents selon la classification moléculaire (luminal A, luminal B, basal et HER2 positif). Parmi ces différents sous-types, seuls les échantillons du sous-type luminal A appartiennent au grade I, les autres échantillons étant tous de grade III. Cette étude a montré que GABARAPL1 est exprimée de manière hétérogène dans l'ensemble des tumeurs mais aucune corrélation n'a pu être établie avec le grade des lésions. Nous avons également étudié l'expression des protéines LC3 et p62, des acteurs de l'autophagie, mais là encore aucune différence d'expression n'a pu être reliée à un grade des tumeurs. Cette étude devra être poursuivie sur un plus grand nombre d'échantillons englobant tous les sous-types (luminal A, luminal B, basal, HER2 positif et normal) ainsi que des tissus sains adjacents pour une meilleure comparaison et afin d'obtenir des différences significatives.

Il faudra notamment déterminer si l'absence de différence d'expression de GABARAPL1 dans ces échantillons n'est pas liée à leur hétérogénéité. En effet, cela pourrait s'expliquer par le fait que ces échantillons contiennent aussi des cellules saines. En effet, il a été montré, que dans certains cas, l'autophagie est inhibée dans les cellules cancéreuses mais augmentée dans les cellules adjacentes saines (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010). Cette hypothèse pourra être vérifiée grâce à des marquages immunohistochimiques sur des coupes de différents types de cancers du sein.

L'expression du messenger et de la protéine Beclin1 a également été étudiée dans des tumeurs du sein et les résultats ont montré que le messenger aussi bien que la protéine sont faiblement exprimés dans ces tumeurs mais aucune corrélation entre le taux de la protéine Beclin1 et le taux des protéines marqueurs des tumeurs de sein tels que BRCA1 et HER2 n'a pu être établie (Li *et al.*, 2010). Cependant, les auteurs ont étudié la méthylation des régions régulatrices et promotrice du gène et ont montré que le promoteur et l'intron 2 sont hyperméthylés au niveau des îlots CpG, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'expression de Beclin1 dans les tumeurs de sein (Li *et al.*, 2010). Ainsi, il sera intéressant

d'étudier les modifications épigénétiques qui pourraient être responsables de la diminution de l'expression de *gabarapl1* dans les tumeurs du sein, d'autant plus que les régions promotrices de ce gène sont très riches en îlots CpG.

Nous avons également analysé l'expression de la protéine GABARAPL1 dans 22 méningiomes (21 de grade 1 et 1 de grade 2) et 1 méninge saine. Les résultats ont montré que GABARAPL1 s'exprime de manière hétérogène dans les méningiomes analysés. Cependant, on peut noter que la protéine GABARAPL1 n'est pas détectée dans la méninge saine et est très fortement exprimée dans le méningiome de grade II. Malgré le nombre réduit d'échantillons, nous avons observé une différence d'expression de GABARAPL1 selon les sous-types. Ainsi, une faible expression de GABARAPL1 a été observée dans les méningiomes psammomateux par rapport aux méningiomes méningothéliaux et transitionnels. Notre étude confirme les données précédemment obtenues au niveau du messager (Tolle, 2008). En revanche, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de GABARAPL1 et le sexe des patients mais nous avons remarqué que l'expression de GABARAPL1 diminue avec l'âge de patientes. En effet, l'expression la plus importante a été observée chez une patiente âgée de 36 ans alors qu'elle est plus faible chez les patientes avec une moyenne d'âge de 50 ans. La plus faible expression de GABARAPL1 est observée chez des patientes de plus de 60 ans sauf pour un échantillon. Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux déjà obtenus au niveau du messager *gabarapl1*. Cette étude sera poursuivie sur 40 échantillons supplémentaires obtenus auprès de la tumorothèque de Strasbourg.

Il faut également noter que ces différences ne sont pas observées pour la protéine LC3 qui présente des niveaux d'expression différents selon les tumeurs, même au sein d'un même sous-type. La seule concordance entre les deux protéines est observée pour la méninge saine qui présente une expression très faible ou non détectable des deux protéines et le méningiome de grade II qui présente, quant à lui, une expression très élevée des deux protéines.

Afin de compléter la classification histologique des méningiomes, il a été proposé d'y associer de nouvelles données moléculaires afin d'améliorer la caractérisation de ces tumeurs ainsi que la stratégie des traitements utilisés (Mawrin & Perry, 2010). Il a tout d'abord été montré que certaines protéines sont des marqueurs des méningiomes comme la protéine EMA qui est exprimée par tous les méningiomes. Les méningiomes expriment également la Vimentine et sont positifs pour la protéine S100. En revanche, la cytokératine n'est pas exprimée dans les méningiomes, exceptée la CK18 (Mawrin & Perry, 2010). D'autres gènes ont, par contre, été décrits pour présenter une altération de leur expression selon le type ou le

grade des méningiomes. Par exemple, le gène *nf2* (*NeuroFibromatosis 2*), localisé sur le chromosome 22, est altéré dans 40 à 70 % des méningiomes. En effet, le promoteur de ce gène est hyperméthylé et plusieurs mutations affectent son expression dans les différents types histologiques de méningiomes. Les plus fortes fréquences de mutations sont observées dans les méningiomes fibromateux, psammomateux et transitionnels. Récemment, un autre gène porté par le chromosome 22 a été décrit pour être faiblement exprimé dans les méningiomes, le gène *bcr* (*breakpoint cluster region*). Le gène *timp3* (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*), également localisé sur le chromosome 22, est hyperméthylé et est impliqué dans le développement des méningiomes agressifs. Il faudra donc rechercher l'expression de ces marqueurs dans nos échantillons afin de déterminer si la protéine GABARAPL1 peut également être considérée comme un marqueur spécifique d'un type de méningiomes et notamment des psammomateux. Nous devons également réaliser des marquages immunohistochimiques sur coupes afin de déterminer la localisation de cette protéine dans ces échantillons.

Par ailleurs, l'expression de la protéine Beclin1 a également été étudiée dans différentes tumeurs cérébrales dont des méningiomes (Miracco *et al.*, 2007). Il a été montré que l'expression de Beclin1 est significativement diminuée dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains adjacents. De plus, l'expression de Beclin1 est diminuée dans les grades II par rapport aux grades I (Miracco *et al.*, 2007). Il sera donc intéressant d'étudier l'expression de Beclin1 dans nos échantillons et déterminer si sa variation d'expression est similaire à celle précédemment décrite.

2.4)-En réponse aux traitements anti-cancéreux

Au cours d'une étude récente effectuée au laboratoire visant à identifier de nouveaux partenaires de la protéine GABARAPL1, il a été démontré que l'expression de la protéine GABARAPL1 est régulée par des inhibiteurs du protéasome (publication intitulée « *Identification of HSP90 α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein* » placée en annexe).

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont démontré, pour la première fois, que la protéine GABARAPL1 est une protéine cliente de HSP90 et que l'inhibition de cette interaction induit la dégradation de GABARAPL1 par le protéasome.

Il a été décrit dans la littérature que certains inhibiteurs du protéasome peuvent induire l'autophagie et sont également utilisés en thérapeutique pour le traitement de certains cancers.

En effet, des traitements par le MG132 et le Bortezomib induisent la formation des autophagosomes marquée par la détection de la forme modifiée de la protéine LC3, LC3-II. D'autre part, une étude a montré que le Bortezomib, une drogue utilisée pour le traitement de tumeurs du sein ER⁺ (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2010), induit une accumulation de la forme modifiée LC3-II et de la protéine p62 dans des cellules de cancer du sein résistantes aux anti-estrogènes (TR5). Cette inhibition est médiée par le blocage de la cathepsine L, une enzyme lysosomale, nécessaire à la dégradation des protéines par autophagie. Dans ces cellules, le Bortezomib induit une mort cellulaire dépendante des caspases précédée par une inhibition de l'autophagie (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2010).

Il a également été décrit que la protéine Beclin1 régule la réponse de cellules MCF-7 aux composés estrogéniques (estradiol-17 β) et à des anti-estrogènes (Raloxifène et le 4OH-Tamoxifène) (John *et al.*, 2008). Les auteurs ont notamment décrit que la surexpression de Beclin1 diminue la réponse de gènes régulés par les estrogènes (*fos*, *c-myc*, *erg-1* et *nur77*) et que les cellules surexprimant Beclin1 incubées avec des estrogènes présentent un taux de prolifération plus faible que les cellules sauvages. Etant donné le caractère estrogéno-dépendant de la protéine GABARAPL1, il sera donc intéressant de déterminer si l'expression de cette protéine est régulée dans des cellules cancéreuses résistantes aux anti-estrogènes et de déterminer si le flux autophagique est altéré dans ces cellules.

De plus, il est actuellement admis que l'autophagie peut induire l'apparition d'une résistance des cellules cancéreuses à certains traitements. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie est actuellement proposée pour resensibiliser les cellules à ces différents traitements (Chen *et al.*, 2010). Au contraire, l'expression de Beclin1 dans des cellules de cancer de l'utérus augmente leur sensibilité aux traitements induisant l'apoptose tels que le paclitaxel, l'épirubicine, le cisplatin ou le 5-fluorouracil (Sun *et al.*, 2010). La régulation positive ou négative de l'expression de ces molécules impliquées dans l'autophagie pourrait donc permettre d'adapter la réponse autophagique et donc potentialiser l'activité de certains traitements actuels.

Afin de déterminer si l'expression de GABARAPL1 peut être régulée par une association de composés chimiques ciblant la voie du protéasome et celle de l'autophagie, nous avons soumis des cellules MCF-7 à plusieurs traitements associant par exemple le Bortezomib à la 3-MA ou la Bafilomycine A1. Au cours de ces expériences, nous avons observé une augmentation du taux de la protéine après traitement avec le Bortezomib, la 3-MA ou la Bafilomycine A1 mais aucun effet synergique n'a été observé après traitement avec les deux composés. Pour poursuivre cette étude, il sera intéressant d'étudier l'effet de la

surexpression de la protéine GABARAPL1 sur la réponse des cellules MCF-7 au Bortezomib et sur la mort cellulaire induite par le Bortezomib. Pour cela, des cellules MCF-7 et MCF-7:FLAG-GABARAPL1-6HIS seront traitées par le Bortezomib seul ou en association avec des inhibiteurs de l'autophagie (3-MA ou BafA1) puis des tests MTT et d'exclusion au bleu Trypan seront effectués afin d'évaluer la prolifération et la viabilité cellulaires.

Des tests préliminaires au cours desquels des cellules MCF-7 sauvages et surexprimant la protéine GABARAPL1 ont été incubées avec un composé anti-estrogénique décrit pour induire l'autophagie, le 4OH-Tamoxifène, ou avec un composé anti-prolifératif décrit pour induire l'autophagie, la Rapamycine, ont été effectués. Nous avons observé que la surexpression de GABARAPL1 ne potentialise pas l'effet du 4OH-Tamoxifène ou de la Rapamycine. Cette étude devra être poursuivie avec de nouveaux composés ou avec de nouvelles associations de composés (par exemple, un inhibiteur de l'autophagie associé avec des molécules ciblant le protéasome ou les microtubules). Des travaux *in vitro* effectués en collaboration avec le laboratoire du Dr. Uwe Schlattner ont décrit que GABARAPL1 est phosphorylée par l'AMPK. Ces travaux devront être poursuivis afin de déterminer si un activateur, AICAR, ou un inhibiteur, Compound C, de l'AMPK peuvent réguler la phosphorylation de GABARAPL1 et son éventuelle expression, stabilité ou activité dans les cellules. En effet, il a déjà été montré que la protéine LC3 est phosphorylée par la PKC dans les cellules et qu'elle doit être déphosphorylée avant d'être associée aux vésicules autophagiques (Jiang *et al.*, 2010a).

3)-Perspectives à long terme

Les données obtenues au cours de ce travail ont permis, d'une part, de caractériser un nouveau rôle de la protéine GABARAPL1 au cours de l'autophagie et, d'autre part, d'étudier son expression dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques. La caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 sera poursuivie au laboratoire dans deux conditions physiopathologiques : au cours de la tumorigenèse et au cours de la neurodégénérescence.

Jusqu'à maintenant, le gène *gabarapl1* a été principalement étudié dans les cancers et plus particulièrement dans le cancer du sein. Il a été montré qu'il peut être considéré comme un facteur de bon pronostic et qu'il peut être considéré comme un gène suppresseur de tumeurs, du moins *in vitro*. En effet, l'expression de la protéine GABARAPL1 inhibe la prolifération des cellules MCF-7 et diminue leur capacité à former des colonies sur agar mou comme cela a été déjà montré pour la protéine GABARAP (Klebig *et al.*, 2005). Pour

compléter les résultats obtenus *in vitro*, les cellules MCF-7 et MDA-MB231 sauvages et qui surexpriment la protéine GABARAPL1 seront injectées dans des souris *nude* immunodéficientes. La croissance des tumeurs ainsi que leur pouvoir métastatique seront quantifiés régulièrement afin de déterminer si la protéine GABARAPL1 peut jouer un rôle au cours de la progression tumorale.

Par ailleurs, l'expression du gène *gabapapll* a été largement étudiée dans le système nerveux central. Ainsi, une cartographie d'expression a été établie et a montré que *gabapapll* est exprimé exclusivement dans les neurones dans toutes les zones du cerveau de rat mais préférentiellement dans des neurones impliqués dans les fonctions moteurs, somesthésiques et neuroendocrines. De plus, une forte expression du gène *gabapapll* a été observée dans des neurones dopaminergiques de la région *pars compacta* de la substance noire, une région importante dans la maladie de Parkinson (Tolle *et al.*, 2008). De plus, il a été montré une interaction de la protéine GABARAPL1 avec la protéine α -synucléine, une protéine importante lors de la progression de la maladie de Parkinson (Schnack *et al.*, 2008). L'étude de l'interaction de GABARAPL1 avec α -synucléine dans la lignée SH-SY5Y est en cours dans notre laboratoire. Cette étude permettra de définir si la protéine GABARAPL1 intervient dans l'incorporation d'agrégats d' α -synucléine dans les autophagosomes et donc lors de leur dégradation par l'autophagie. Un rôle de la protéine GABARAPL1 dans la protection contre les maladies dégénératives pourrait alors être suggéré.

Bibliographie

- Aaronson SA, Todaro GJ (1968) Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol* **72**: 141-148
- Agarraberes FA, Dice JF (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* **114**: 2491-2499
- Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* **137**: 825-834
- Aguirre-Ghiso JA (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**: 834-846
- Ahlberg J, Henell F, Glaumann H (1982) Proteolysis in isolated autophagic vacuoles from rat liver. Effect of pH and of proteolytic inhibitors. *Exp Cell Res* **142**: 373-383
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**: 59-65
- Alam J, Deharo D, Redding KM, Re RN, Cook JL (2010) C-terminal processing of GABARAP is not required for trafficking of the angiotensin II type 1A receptor. *Regul Pept* **159**: 78-86
- Aoki H, Kondo Y, Aldape K, Yamamoto A, Iwado E, Yokoyama T, Hollingsworth EF, Kobayashi R, Hess K, Shinojima N, Shingu T, Tamada Y, Zhang L, Conrad C, Bogler O, Mills G, Sawaya R, Kondo S (2008) Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Autophagy* **4**: 467-475
- Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A (2008) Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* **68**: 1485-1494
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Noguez C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**: 1050-1059
- Ascenzi P, Bocedi A, Marino M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* **27**: 299-402
- Atlashkin V, Kreykenbohm V, Eskelinen EL, Wenzel D, Fayyazi A, Fischer von Mollard G (2003) Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol* **23**: 5198-5207
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* **182**: 685-701
- Aziz MH, Nihal M, Fu VX, Jarrard DF, Ahmad N (2006) Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* **5**: 1335-1341
- Bampton ET, Goemans CG, Niranjan D, Mizushima N, Tolkovsky AM (2005) The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* **1**: 23-36
- Bavro VN, Sola M, Bracher A, Kneussel M, Betz H, Weissenhorn W (2002) Crystal structure of the GABA(A)-receptor-associated protein, GABARAP. *EMBO Rep* **3**: 183-189
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**: 68-76

- Belhage B, Hansen GH, Elster L, Schousboe A (1998) Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function. *Perspect Dev Neurobiol* **5**: 235-246
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, 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
- Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafrasse C, Tolle F, Fraichard A, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Descotes F (2010) High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer* **102**: 1024-1031
- Betin VMS, Lane JD (2009) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science* **122**: 2554-2566
- Bjornstrom L (2005) Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology* **19**: 833-842
- Boden MJ (2006) Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* **132**: 379-392
- Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F (1997) Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* **14**: 195-202
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868
- Budanov AV, Karin M (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**: 451-460
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* **17**: 1595-1607
- Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**: 1189-1198
- Calnan DR, Brunet A (2008) The FoxO code. *Oncogene* **27**: 2276-2288
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327-1333
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-1657
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**: 2933-2942
- Castagnetta L, Granata OM, Cocciadiferro L, Sietta A, Polito L, Bronte G, Rizzo S, Campisi I, Agostara B, Carruba G (2004) Sex steroids, carcinogenesis, and cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* **1028**: 233-246
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M (2010) GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* **6**: 1-11
- Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC (2010) Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J* **29**: 606-618

- Chang SB, Miron P, Miron A, Iglehart JD (2007) Rapamycin inhibits proliferation of estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *J Surg Res* **138**: 37-44
- Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY (2006) GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* **281**: 7983-7993
- Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY (2011) Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem*
- Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A (1999) Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* **274**: 7-10
- Chen N, Debnath J (2010) Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* **584**: 1427-1435
- Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J (2010) Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1806**: 220-229
- Chen Y, Chen C, Kotsikorou E, Lynch DL, Reggio PH, Liu-Chen LY (2008) GEC1-Opioid Receptor Binding Involves Hydrophobic Interactions: GEC1 HAS CHAPERONE-LIKE EFFECT. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 1673-1685
- Chen Y, Lu Y, Lu C, Zhang L (2009) Beclin-1 expression is a predictor of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlated to hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression. *Pathol Oncol Res* **15**: 487-493
- Chen ZW, Chang CSS, Leil TA, Olsen RW (2007) C-Terminal Modification Is Required for GABARAP-Mediated GABAA Receptor Trafficking. *Journal of Neuroscience* **27**: 6655-6663
- Chiacchiera F, Matrone A, Ferrari E, Ingravallo G, Lo Sasso G, Murzilli S, Petruzzelli M, Salvatore L, Moschetta A, Simone C (2009) p38 α blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1 α - to FoxO-dependent transcription. *Cell Death and Differentiation* **16**: 1203-1214
- Chiacchiera F, Simone C (2010) The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. *Cell Cycle* **9**
- Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M (1999) Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**: 249-252
- Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**: 195-213
- Cook JL, Re RN, deHaro DL, Abadie JM, Peters M, Alam J (2008) The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **102**: 1539-1547
- Coppola D, Khalil F, Eschrich SA, Boulware D, Yeatman T, Wang H-G (2008) Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer* **113**: 2665-2670
- Coyle JE, Nikolov DB (2003) GABARAP: lessons for synaptogenesis. *Neuroscientist* **9**: 205-216
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB (2002) Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33**: 63-74
- Crider BP, Xie XS, Stone DK (1994) Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *J Biol Chem* **269**: 17379-17381

- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**: 121-134
- Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **21**: 142-150
- Cuervo AM, Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**: 501-503
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* **14**: 2950-2961
- De Duve C, Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**: 435-492
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**: 51-64
- Dice JF (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* **15**: 305-309
- Dice JF (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **3**: 295-299
- Dikic I, Johansen T, Kirkin V (2010) Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res* **70**: 3431-3434
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290
- Dunn WA, Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* **4**: 139-143
- Dupont WD, Page DL (1985) Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* **312**: 146-151
- Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* **13**: 343-354
- Efeyan A, Sabatini DM (2010) mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 169-176
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* **16**: 966-975
- Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ (2011) Oncogenic ras-induced expression of noxa and beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* **42**: 23-35
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J* **15**: 2286-2287
- Erlich S, Mizrachy L, Segev O, Lindenboim L, Zmira O, Adi-Harel S, Hirsch JA, Stein R, Pinkas-Kramarski R (2007) Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy* **3**: 561-568
- Eskelinen EL (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**: 1-10
- Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ (2007) The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* **67**: 3043-3053
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8204-8209
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F

- (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**: 1121-1125
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**: 193-204
- Frith MC, Hansen U, Weng Z (2001) Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* **17**: 878-889
- Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A (2008) Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* **99**: 1813-1819
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T (2008a) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* **19**: 4651-4659
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008b) The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 2092-2100
- Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B (2005) The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* **1**: 46-52
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* **349**: 629-634
- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, 3rd, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG (1993) Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* **5**: 230-235
- Gan B, Guan JL (2008) FIP200, a key signaling node to coordinately regulate various cellular processes. *Cell Signal* **20**: 787-794
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **284**: 12297-12305
- Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X (2011) Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ*
- Gao Z, Gammoh N, Wong PM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jiang X (2010) Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome. *Autophagy* **6**: 126-137
- Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P (1990) Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* **63**: 1267-1276
- Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* **221**: 3-12
- Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**: 7410-7425
- Gutierrez MG, Munafo DB, Beron W, Colombo MI (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* **117**: 2687-2697
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell* **141**: 656-667
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y (2007) The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37298-37302

- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885-889
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* **181**: 497-510
- Harkonen PL, Makela SI (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**: 297-305
- He C, Klionsky DJ (2007) Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy* **3**: 271-274
- He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, Pei Y, Chen Y, Ling W, Wu C, Zhao S, Liu JO, Yu L (2003) Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* **278**: 29278-29287
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL (2003) A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem* **278**: 51841-51850
- Hirota Y, Tanaka Y (2009) A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2913-2932
- Hockel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* **93**: 266-276
- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* **419**: 841-844
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20**: 1981-1991
- Huang H, Regan KM, Lou Z, Chen J, Tindall DJ (2006) CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science* **314**: 294-297
- Huang H, Tindall DJ (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science* **120**: 2479-2487
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* **19**: 5360-5372
- Itoh T, Fujita N, Kanno E, Yamamoto A, Yoshimori T, Fukuda M (2008) Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**: 2916-2925
- Izquierdo I, Medina JH (1991) GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 260-265
- Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H (2000) Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res* **60**: 6201-6207
- Jacobs FMJ (2003) FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 35959-35967
- Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**: 4837-4848
- Jiang H, Cheng D, Liu W, Peng J, Feng J (2010a) Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochem Biophys Res Commun* **395**: 471-476

Jiang S, Heller B, Tagliabracci VS, Zhai L, Irimia JM, DePaoli-Roach AA, Wells CD, Skurat AV, Roach PJ (2010b) Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem* **285**: 34960-34971

Jin S (2006) Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy* **2**: 80-84

Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**: 57-68

John S, Nayvelt I, Hsu HC, Yang P, Liu W, Das GM, Thomas T, Thomas TJ (2008) Regulation of Estrogenic Effects by Beclin 1 in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* **68**: 7855-7863

Johung K, Goodwin EC, DiMaio D (2007) Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. *J Virol* **81**: 2102-2116

Jones C, Hammer RE, Li WP, Cohen JC, Hobbs HH, Herz J (2003) Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Biol Chem* **278**: 29024-29030

Jordan VC, Brodie AM (2007) Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids* **72**: 7-25

Joubert PE, Pombo Gregoire I, Meiffren G, Roubourdin-Combe C, Faure M (2011) [Autophagy and pathogens: <<Bon appetit Messieurs!>>]. *Med Sci (Paris)* **27**: 41-47

Jouvenot M, Pellerin I, Alkhalaf M, Marechal G, Royez M, Adessi GL (1990) Effects of 17 beta-estradiol and growth factors on c-fos gene expression in endometrial epithelial cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* **72**: 149-157

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **20**: 1992-2003

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* **19**: 5720-5728

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**: 2805-2812

Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**: 142-146

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**: 1507-1513

Kanematsu T, Hirata M (2002) [The analysis of protein-protein interaction with special reference to PRIP-1]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **119**: 241-246

Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH (2009) Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* **217**: 702-706

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

Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, Vela D, Gong M, Salazar R, Frazier OH, Taegtmeyer H (2009) Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* **120**: S191-197

- Katayama H, Yamamoto A, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A (2008) GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**: 1-12
- Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, Harrison TJ, Wilkinson RJ, Tyrrell DA, Holgate ST, Kerr JR (2005) Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* **58**: 826-832
- Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, Cuervo AM (2008) Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 2179-2192
- Kennaway DJ (2004) The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update* **11**: 91-101
- Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* **2**: 330-335
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253
- Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH, Yoo NJ (2008) Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol* **39**: 1059-1063
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147**: 435-446
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Overvatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**: 505-516
- Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, Moss SJ (2001) The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* **18**: 13-25
- Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, Petersen I (2005) Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* **65**: 394-400
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**: 215-225; discussion 226-219
- Klinge CM (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* **29**: 2905-2919
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-545
- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, Olsen RW, Betz H (2000) The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8594-8599
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880-884
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J,

- Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**: 1149-1163
- Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**: 280-293
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**: 1019-1031
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T, Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032-1036
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**: 193-205
- Kuroyanagi H, Yan J, Seki N, Yamanouchi Y, Suzuki Y, Takano T, Muramatsu M, Shirasawa T (1998) Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of *Caenorhabditis elegans*: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. *Genomics* **51**: 76-85
- Kusama Y, Sato K, Kimura N, Mitamura J, Ohdaira H, Yoshida K (2009) Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis* **14**: 1165-1175
- Lainez S, Valente P, Ontoria-Oviedo I, Estevez-Herrera J, Camprubi-Robles M, Ferrer-Montiel A, Planells-Cases R (2010) GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J* **24**: 1958-1970
- Le Grand JN C, FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M (2011) GABARAPL1 (GEC1) : original or copycat ? *Autophagy* **7**: 1-10
- Lecker SH (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *The FASEB Journal* **18**: 39-51
- Lee JH, Rho SB, Chun T (2005) GABAA receptor-associated protein (GABARAP) induces apoptosis by interacting with DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 47 (DDX 47). *Biotechnol Lett* **27**: 623-628
- Leil TA, Chen ZW, Chang CS, Olsen RW (2004) GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* **24**: 11429-11438
- Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* **9**: 749-758
- Levine B (2007) Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* **446**: 745-747
- Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**: 767-777
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**: 463-477
- Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**: 2679-2688
- Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H (2008) Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Annals of Surgical Oncology* **16**: 761-771
- Li Z, Chen B, Wu Y, Jin F, Xia Y, Liu X (2010) Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer* **10**: 98

- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* **8**: 688-699
- Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, 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 CC, Wang C, Peng X, Gan B, Guan JL (2010) Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J Biol Chem* **285**: 3499-3509
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B (1998) Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* **72**: 8586-8596
- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* **136**: 61-70
- Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, Liu Z, Cao W (2009) Hepatic Autophagy Is Suppressed in the Presence of Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: INHIBITION OF FoxO1-DEPENDENT EXPRESSION OF KEY AUTOPHAGY GENES BY INSULIN. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 31484-31492
- Liu L, Yang M, Kang R, Wang Z, Zhao Y, Yu Y, Xie M, Yin X, Livesey KM, Lotze MT, Tang D, Cao L (2010) HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells. *Leukemia* **25**: 23-31
- Liu L, Yang M, Kang R, Wang Z, Zhao Y, Yu Y, Xie M, Yin X, Livesey KM, Lotze MT, Tang D, Cao L (2011) DAMP-mediated autophagy contributes to drug resistance. *Autophagy* **7**: 112-114
- Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM, Debnath J (2011) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* **22**: 165-178
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**: 97-109
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11162-11166
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**: 569-602
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007a) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* **26**: 2527-2539
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007b) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 741-752
- Malyala A, Kelly M, Ronnekleiv O (2005) Estrogen modulation of hypothalamic neurons: Activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids* **70**: 397-406
- Malyala A, Pattee P, Nagalla SR, Kelly MJ, Ronnekleiv OK (2004) Suppression subtractive hybridization and microarray identification of estrogen-regulated hypothalamic genes. *Neurochem Res* **29**: 1189-1200

- Mameza MG, Lockard JM, Zamora E, Hillefors M, Lavina ZS, Kaplan BB (2007) Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions. *J Neurochem* **103**: 927-941
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**: 458-471
- Mansuy-Schlick V, Delagemourroux R, Jouvenot M, Boireau W (2006a) Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements. *Biosensors and Bioelectronics* **21**: 1830-1837
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M (2006b) Specific distribution of gabarap, gec1/gabarap Like 1, gate16/gabarap Like 2, lc3 messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* **1073-1074**: 83-87
- Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R (2004) GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 639-648
- Mansuy V, Geller S, Rey JP, Campagne C, Boccard J, Poulain P, Prevot V, Pralong FP (2011) Phenotypic and molecular characterization of proliferating and differentiated GnRH-expressing GnV-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* **332**: 97-105
- Mansuy V, Risold P-Y, Glauser M, Fraichard A, Pralong FP (2009) Expression of the GABAA receptor associated protein Gec1 is circadian and dependent upon the cellular clock machinery in GnRH secreting GnV-3 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **307**: 68-76
- Marino G, Fernandez AF, Cabrera S, Lundberg YW, Cabanillas R, Rodriguez F, Salvador-Montoliu N, Vega JA, Germana A, Fueyo A, Freije JM, Lopez-Otin C (2010a) Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest* **120**: 2331-2344
- Marino G, Madeo F, Kroemer G (2010b) Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol*
- Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C (2007) Tissue-specific Autophagy Alterations and Increased Tumorigenesis in Mice Deficient in Atg4C/Autophagin-3. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 18573-18583
- Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC (2007) NMDA Receptor Activation Potentiates Inhibitory Transmission through GABA Receptor-Associated Protein-Dependent Exocytosis of GABAA Receptors. *Journal of Neuroscience* **27**: 14326-14337
- Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Chiavarina B, Bonuccelli G, Casey T, Tsirigos A, Migneco G, Witkiewicz A, Balliet R, Mercier I, Wang C, Flomenberg N, Howell A, Lin Z, Caro J, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP (2010) The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth": A simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle* **9**: 4297-4306
- Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H (1981) Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **36**: 219-234
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, DiPaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E (2009) Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell* **137**: 1062-1075
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & Development* **21**: 1367-1381
- Mathew R, White E (2007) Why sick cells produce tumors: the protective role of autophagy. *Autophagy* **3**: 502-505

- Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T (2010) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology* **190**: 511-521
- 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, Yoshimori T (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**: 385-396
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11285-11290
- Mawrin C, Perry A (2010) Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* **99**: 379-391
- McDonald PH, Cote NL, Lin FT, Premont RT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1999) Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem* **274**: 10677-10680
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**: 649-662
- Miao Y, Zhang Y, Chen Y, Chen L, Wang F (2010) GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatogastroenterology* **57**: 257-261
- Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, Harris AL (2009) The Role of ATF4 Stabilization and Autophagy in Resistance of Breast Cancer Cells Treated with Bortezomib. *Cancer Research* **69**: 4415-4423
- Miracco C, Cevenini G, Franchi A, Luzzi P, Cosci E, Mourmouras V, Monciatti I, Mannucci S, Biagioli M, Toscano M, Moretti D, Lio R, Massi D (2010) Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions. *Hum Pathol* **41**: 503-512
- Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V, Falzarano SM, Pirtoli L, Tosi P (2007) Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* **30**: 429-436
- Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **22**: 132-139
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, 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, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-1075
- Mizushima N, Noda T, 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, Sugita H, Yoshimori T, 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
- Moretti L, Attia A, Kim KW, Lu B (2007) Crosstalk between Bak/Bax and mTOR signaling regulates radiation-induced autophagy. *Autophagy* **3**: 142-144
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G (2009) Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1524-1532
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63
- Mousavi SA, Kjekken R, Berg TO, Seglen PO, Berg T, Brech A (2001) Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1510**: 243-257

- Munafò DB, Colombo MI (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* **114**: 3619-3629
- Munoz E, Brewer M, Baler R (2002) Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. *J Biol Chem* **277**: 36009-36017
- Munz C (2009) Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol* **27**: 423-449
- Najbauer J, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA (2009) Autophagy Facilitates the Development of Breast Cancer Resistance to the Anti-HER2 Monoclonal Antibody Trastuzumab. *PLoS ONE* **4**: e6251
- Narita M, Young AR (2009) Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy* **5**: 1046-1047
- Nemos C, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Adami P (2004) Onset of direct 17-beta estradiol effects on proliferation and c-fos expression during oncogenesis of endometrial glandular epithelial cells. *Exp Cell Res* **296**: 109-122
- Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R (2003) Expression of *gec1/GABARAPL1* versus *GABARAP* mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **119**: 216-219
- Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, Minematsu-Ikeguchi N, Yokota M, Ohsumi M, Ueno T, Kominami E (2003) The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem* **278**: 39517-39526
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **461**: 654-658
- Nishiyama J, Miura E, Mizushima N, Watanabe M, Yuzaki M (2007) Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* **3**: 591-596
- Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F (2010) Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Letters* **584**: 1379-1385
- Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y, Klionsky DJ (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* **148**: 465-480
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Löhr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dötsch V, Ney PA, Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports* **11**: 45-51
- O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna S (2011) Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy* **7**
- O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H (2005) GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *European Journal of Neuroscience* **22**: 2644-2648
- Obsilova V, Vecer J, Herman P, Pabianova A, Sulc M, Teisinger J, Boura E, Obsil T (2005) 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **44**: 11608-11617
- Ogawa S (1998) Roles of Estrogen Receptor- Gene Expression in Reproduction-Related Behaviors in Female Mice. *Endocrinology* **139**: 5070-5081
- Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1603**: 113-128
- Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M (2000) Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3

related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res* **85**: 1-12

Olsen RW, Avoli M (1997) GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* **38**: 399-407

Orsi A, Polson HE, Tooze SA (2010) Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 150-156

Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD (1997) Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J Biol Chem* **272**: 2477-2485

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, 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

Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC (2008) Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ* **15**: 1572-1581

Pardo R, Lo Re A, Archange C, Ropolo A, Papademetrio DL, Gonzalez CD, Alvarez EM, Iovanna JL, Vaccaro MI (2010) Gemcitabine induces the VMP1-mediated autophagy pathway to promote apoptotic death in human pancreatic cancer cells. *Pancreatology* **10**: 19-26

Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E (2006) High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C917-924

Parry P, Wei Y, Evans G (1994) Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 79-84

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**: 927-939

Paz Y (2000) Structure of GATE-16, Membrane Transport Modulator and Mammalian Ortholog of Autophagocytosis Factor Aut7p. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 25445-25450

Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL (1993) Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* **90**: R17-21

Periyasamy-Thandavan S, Jackson WH, Samaddar JS, Erickson B, Barrett JR, Raney L, Gopal E, Ganapathy V, Hill WD, Bhalla KN, Schoenlein PV (2010) Bortezomib blocks the catabolic process of autophagy via a cathepsin-dependent mechanism, affects endoplasmic reticulum stress and induces caspase-dependent cell death in antiestrogen-sensitive and resistant ER+ breast cancer cells. *Autophagy* **6**: 19-35

Pfeiffer A, Brantl V, Herz A, Emrich HM (1986a) Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. *Science* **233**: 774-776

Pfeiffer A, Knepel W, Braun S, Meyer HD, Lohmann H, Brantl V (1986b) Effects of a kappa-opioid agonist on adrenocorticotrophic and diuretic function in man. *Horm Metab Res* **18**: 842-848

Pimkin M, Pimkina J, Markham GD (2009) A regulatory role of the Bateman domain of IMP dehydrogenase in adenylate nucleotide biosynthesis. *J Biol Chem* **284**: 7960-7969

Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S, Mourmouras V, Rubino G, Miracco C (2009) The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* **5**: 930-936

Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M (2004) Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **51**: 55-67

Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**

Poole B, Ohkuma S, Warburton MJ (1977) The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation. *Acta Biol Med Ger* **36**: 1777-1788

Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**: 251-260

Proikas-Cezanne T, Ruckerbauer S, Stierhof YD, Berg C, Nordheim A (2007) Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett* **581**: 3396-3404

Pursiheimo JP, Rantanen K, Heikkinen PT, Johansen T, Jaakkola PM (2008) Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28**: 334-344

Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM (2008) Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat* **112**: 389-403

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**: 1809-1820

Rabow LE, Russek SJ, Farb DH (1995) From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse* **21**: 189-274

Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* **12**: 747-757

Razi M, Chan EY, Tooze SA (2009) Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J Cell Biol* **185**: 305-321

Reggiori F, Klionsky DJ (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* **1**: 11-21

Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-941

Roberts SS, Mendonca-Torres MC, Jensen K, Francis GL, Vasko V (2009) GABA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Pathol Oncol Res* **15**: 645-650

Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, Hsieh YC, Turner MA, Wang Z, Tian Q, Rodland MJ, Reynolds CP, Seeger RC, Nagalla SR (2004) GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **22**: 4127-4134

Robinson LJ, Aniento F, Gruenberg J (1997) NSF is required for transport from early to late endosomes. *J Cell Sci* **110** (Pt 17): 2079-2087

Rothman JE (1994) Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**: 81-96

Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* **120**: 127-141

- Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentinis B, Catalanotti F, Giazzon M, Dumitriu IE, Muller S, Iannacone M, Traversari C, Bianchi ME, Manfredi AA (2004) HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* **5**: 825-830
- Roy S, Debnath J (2010) Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol* **32**: 383-396
- Russnak R, Konczal D, McIntire SL (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J Biol Chem* **276**: 23849-23857
- Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D, Stenmark H (2007) ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* **17**: 1817-1825
- Sabbah M, Courilleau D, Mester J, Redeuilh G (1999) Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11217-11222
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z (2000) GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* **19**: 1494-1504
- Sagne C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, El Mestikawy S, Gasnier B, Giros B (2001) Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7206-7211
- Sakao E, Ishihara A, Horikawa K, Akiyama M, Arai M, Kato M, Seki N, Fukunaga K, Shimizu-Yabe A, Iwase K, Ohtsuka S, Sato T, Kohno Y, Shibata S, Takiguchi M (2003) Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem* **278**: 30450-30457
- Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vazquez P, Blazquez C, Torres S, Garcia S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, Gonzalez-Feria L, Iovanna JL, Guzman M, Boya P, Velasco G (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* **119**: 1359-1372
- Salih DA, Brunet A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 126-136
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* **22**: 159-168
- Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y, Nishikawa T, Shuno Y, Hongo K, Hiyoshi M, Kaneko M, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H (2010) Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer* **10**: 370
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43**: 527-537
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**: 191-195
- Scherz-Shouval R (2002) The COOH Terminus of GATE-16, an Intra-Golgi Transport Modulator, Is Cleaved by the Human Cysteine Protease HsApg4A. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 14053-14058
- Schnack C, Danzer KM, Hengerer B, Gillardon F (2008) Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins. *Neuroscience* **154**: 1450-1457

Schwarten M, Mohrluder J, Ma P, Stoldt M, Thielmann Y, Stangler T, Hersch N, Hoffmann B, Merkel R, Willbold D (2009) Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* **5**: 690-698

Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**: 253-266

Seguin-Py S (2007) Etablissement et caractérisation d'une lignée stable Flp-in-HEK293 exprimant la protéine de fusion FLAG-GEC1-6HIS.

Seguin-Py S (2011) Caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 par identification de nouveaux partenaires protéiques et étude du rôle de GABARAPL1 dans la progression tumorale.

Seilliez I, Gutierrez J, Salmeron C, Skiba-Cassy S, Chauvin C, Dias K, Kaushik S, Tesseraud S, Panserat S (2010) An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **157**: 258-266

Sengupta A, Molkentin JD, Paik JH, DePinho RA, Yutzey KE (2011) FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J Biol Chem* **286**: 7468-7478

Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE (2009) FoxO Transcription Factors Promote Autophagy in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 28319-28331

Shankar A, Loizidou M, Taylor I (1996) The vascularity of colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* **22**: 389-396

Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* **16**: 869-871

Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**: 1013-1019

Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**: 1221-1228

Shin HW, Hayashi M, Christoforidis S, Lacas-Gervais S, Hoepfner S, Wenk MR, Modregger J, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Nystuen A, Frankel WN, Solimena M, De Camilli P, Zerial M (2005) An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol* **170**: 607-618

Shiratsuchi A, Watanabe I, Takeuchi O, Akira S, Nakanishi Y (2004) Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol* **172**: 2039-2047

Shvets E, Abada A, Weidberg H, Elazar Z (2011) Dissecting the involvement of LC3B and GATE-16 in p62 recruitment into autophagosomes. *Autophagy* **7**

Simonsen A, Birkeland HC, Gillooly DJ, Mizushima N, Kuma A, Yoshimori T, Slagsvold T, Brech A, Stenmark H (2004) Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *J Cell Sci* **117**: 4239-4251

Simonsen A, Stenmark H (2008) Self-eating from an ER-associated cup. *The Journal of Cell Biology* **182**: 621-622

Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, Andersen SL, Stephens RM, Benes FM, Sonntag KC (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* **132**: 1795-1809

Sou Ys (2005) Phosphatidylserine in Addition to Phosphatidylethanolamine Is an in Vitro Target of the Mammalian Atg8 Modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 3017-3024

Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2006) Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *J Biol Chem* **281**: 3017-3024

Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* **19**: 4762-4775

Storvik M, Arguel MJ, Schmieder S, Delerue-Audegond A, Li Q, Qin C, Vital A, Bioulac B, Gross CE, Wong G, Nahon JL, Bezdard E (2010) Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* **38**: 386-394

Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F (2004a) The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* **9**: 611-618

Sugawara T, Nomura E, Nakajima A, Sakuragi N (2004b) Characterization of binding between SF-1 and Sp1: predominant interaction of SF-1 with the N-terminal region of Sp1. *J Endocrinol Invest* **27**: 133-141

Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q (2008) Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19211-19216

Sun Y, Liu J-h, Jin L, Lin S-m, Yang Y, Sui Y-x, Shi H (2010) Over-expression of the Beclin1 gene upregulates chemosensitivity to anti-cancer drugs by enhancing therapy-induced apoptosis in cervix squamous carcinoma CaSki cells. *Cancer Letters* **294**: 204-210

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mule JJ, Pledger WJ, Wang HG (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**: 1142-1151

Tamai M, Matsumoto K, Omura S, Koyama I, Ozawa Y, Hanada K (1986) In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64. *J Pharmacobiodyn* **9**: 672-677

Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT (2010) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol* **190**: 881-892

Tanida I (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**: 2201-2214

Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2004a) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* **279**: 36268-36276

Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2002) Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* **277**: 13739-13744

Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004b) Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* **279**: 47704-47710

Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004c) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2503-2518

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G,

- Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G (2008a) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**: 676-687
- Tasdemir E, Maiuri MC, Orhon I, Kepp O, Morselli E, Criollo A, Kroemer G (2008b) p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion. *Cell Cycle* **7**: 3006-3011
- Thorburn J, Horita H, Redzic J, Hansen K, Frankel AE, Thorburn A (2009) Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ* **16**: 175-183
- Tolle F (2008) Le gène *gec1* : expression dans les système nerveux central, estrogéno-dépendance et rôle dans l'oncogénèse.
- Tolle F, Risold P, Mansuyschlick V, Rossi E, Boyerguittaut M, Fraichard A, Jouvenot M (2008) Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Research* **1210**: 103-115
- Tooze SA, Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology* **12**: 831-835
- Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF (2007) BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* **27**: 6229-6242
- Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD (2007) Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Research* **35**: 6984-6994
- Turek FW, Van Reeth O (1988) Altering the mammalian circadian clock with the short-acting benzodiazepine, triazolam. *Trends Neurosci* **11**: 535-541
- Ueno T, Ishidoh K, Mineki R, Tanida I, Murayama K, Kadowaki M, Kominami E (1999) Autolysosomal membrane-associated betaine homocysteine methyltransferase. Limited degradation fragment of a sequestered cytosolic enzyme monitoring autophagy. *J Biol Chem* **274**: 15222-15229
- Umezawa H, Takeuchi T, Linuma H, Suzuki K, Ito M (1970) A new microbial product, ouidenone, inhibiting tyrosine hydroxylase. *J Antibiot (Tokyo)* **23**: 514-518
- van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM, Burgering BM (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* **8**: 1064-1073
- Vasudevan N, Pfaff DW (2008) Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* **29**: 238-257
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, Dulieu P, Remy-Martin JP, Jouvenot M, Fraichard A (2001) A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 118-125
- Vernier-Magnin S, Nemos C, Mansuy V, Tolle F, Guichard L, Delagemourroux R, Jouvenot M, Fraichard A (2005) Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1731**: 23-31
- Vernier-Magnin S, Nemos C, Mansuy V, Tolle F, Guichard L, Delagemourroux R, Jouvenot M, Fraichard A (2005) Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1731**: 23-31
- Vicencio JM, Ortiz C, Criollo A, Jones AW, Kepp O, Galluzzi L, Joza N, Vitale I, Morselli E, Tailler M, Castedo M, Maiuri MC, Molgo J, Szabadkai G, Lavandro S, Kroemer G (2009) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ* **16**: 1006-1017
- Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* **39**: 359-407

- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW (1999a) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**: 69-72
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ (1999b) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**: 248-251
- Wang H, Olsen RW (2000) Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J Neurochem* **75**: 644-655
- Wang Y, Dun SL, Huang P, Chen C, Chen Y, Unterwald EM, Dun NJ, Van Bockstaele EJ, Liu-Chen LY (2006) Distribution and ultrastructural localization of GEC1 in the rat CNS. *Neuroscience* **140**: 1265-1276
- Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2004) Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2541-2550
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**: 678-688
- Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z (2011) LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Dev Cell* **20**: 444-454
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal* **29**: 1792-1802
- Wheal HV, Chen Y, Mitchell J, Schachner M, Maerz W, Wieland H, Van Rossum D, Kirsch J (1998) Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* **55**: 611-640
- Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Vanden Berghe T, Lippens S, Vandenabeele P (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* **1**: e18
- Wu WK, Sakamoto KM, Milani M, Aldana-Masangkay G, Fan D, Wu K, Lee CW, Cho CH, Yu J, Sung JJ (2010) Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. *Drug Resist Updat* **13**: 87-92
- Xi G, Hu X, Wu B, Jiang H, Young CY, Pang Y, Yuan H (2011) Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett*
- Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D, Yuan J (2010) Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* **6**: 61-66
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, Zhang P, Gong R, Zhao S (2001) Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* **74**: 408-413
- Xuan Z, Zhang MQ (2005) From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes. *Mech Ageing Dev* **126**: 209-215
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM (2001) Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol* **11**: 361-365
- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* **23**: 33-42

- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**: 682-685
- Yan J, Kuroyanagi H, Tomemori T, Okazaki N, Asato K, Matsuda Y, Suzuki Y, Ohshima Y, Mitani S, Masuho Y, Shirasawa T, Muramatsu M (1999) Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. *Oncogene* **18**: 5850-5859
- Yang Z, Klionsky DJ (2009) An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. **335**: 1-32
- Yang Z, Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 124-131
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1542-1552
- Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Uchiyama Y, Monden M (2008) LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol* **33**: 461-468
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **119**: 3888-3900
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**: 798-803
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**: 1124-1132
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**: 1500-1502
- Yue Z, Friedman L, Komatsu M, Tanaka K (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**: 1496-1507
- Yussman MG, Toyokawa T, Odley A, Lynch RA, Wu G, Colbert MC, Aronow BJ, Lorenz JN, Dorn GW, 2nd (2002) Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat Med* **8**: 725-730
- Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A (2009) Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* **5**: 720-722
- Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, Cadrin M, Omary MB (2007) From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? *Exp Cell Res* **313**: 2033-2049
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **283**: 10892-10903
- Zhang J, Kundu M, Ney PA (2009a) Mitophagy in mammalian cells: the reticulocyte model. *Methods Enzymol* **452**: 227-245
- Zhang J, Ney PA (2008) NIX induces mitochondrial autophagy in reticulocytes. *Autophagy* **4**: 354-356
- Zhang J, Ney PA (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* **16**: 939-946

Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Dorsey FC, Kundu M, Cleveland JL, Ney PA (2009b) Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation. *Blood* **114**: 157-164

J, Brault J, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker S, Goldberg A (2007) FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metabolism* **6**: 472-483

Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* **11**: 468-476

Zhou F, Yang Y, Xing D (2011) Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS Journal* **278**: 403-413

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**: 1103-1110

Publications annexes

Revue acceptée pour publication dans *Autophagy* le 18 avril 2011, publiée en octobre 2011.

Revue : « GABARAPL1: Original or copycat? »

GABARAPL1 (GEC1)

Original or copycat?

Jaclyn Nicole Le Grand,[†] Fatima-Zahra Chakrama,[†] Stéphanie Seguin-Py,[†] Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut*

Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie; EA3922; Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central; IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques; Besançon, France

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: GEC1, GABARAPL1, GABARAP, LC3, autophagy, cancer, neurodegenerative diseases, estrogens

Abbreviations: AMPA receptor, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor; AP-1, activator protein-1; Atg, autophagy-related; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; FoxO, forkhead box proteins; GABA_A, gamma-aminobutyric acid type A; GABA_AR, gamma-aminobutyric acid type A receptor GABARAP; GABA_A receptor-associated protein GABARAPL1, GABARAPL2, GABARAPL3, GABARAP-like 1, 2 and 3; GATE-16, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GEC1, glandular epithelial cell protein 1; GFP, green fluorescent protein; GnRH, gonadotropin releasing hormone; KOR, kappa opioid receptor; MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NBR1, neighbor of BRCA1; NSF, N-ethylmaleimide sensitive factor; *Per1*, period 1 gene; SN, substantia nigra; SNpc, substantia nigra pars compacta; SP-1, specificity protein-1; SQSTM1, sequestosome-1

The *GABARAPL1* (*GABARAP-LIKE 1*) gene was first described as an early estrogen-regulated gene that shares a high sequence homology with *GABARAP* and is thus a part of the *GABARAP* family. *GABARAPL1*, like *GABARAP*, interacts with the GABA_A receptor and tubulin and promotes tubulin polymerization. The *GABARAP* family members (*GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2*) and their close homologs (LC3 and Atg8) are not only involved in the transport of proteins or vesicles but are also implicated in various mechanisms such as autophagy, cell death, cell proliferation and tumor progression. However, despite these similarities, *GABARAPL1* displays a complex regulation that is different from that of other *GABARAP* family members. Moreover, it presents a regulated tissue expression and is the most highly expressed gene among the family in the central nervous system. In this review article, we will outline the specific functions of this protein and also hypothesize about the roles that *GABARAPL1* might have in several important biological processes such as cancer or neurodegenerative diseases.

Introduction

The *GEC1* gene (also known as *GABARAPL1* or *ATG8L*) was first identified in 1993 as an early estrogen-induced gene in quiescent guinea-pig endometrial glandular epithelial cells (GEC).^{1,2} In 1999, a new protein named *GABARAP*

(GABA_A-receptor-associated protein) was described to bind both GABA_AR (γ -aminobutyric acid receptor) and tubulin, and to be involved in intracellular GABA_A receptor trafficking.³ The discovery of this new protein, which shares 87% identity with *GABARAPL1*, led to the classification of *GEC1* as a member of the *GABARAP* family.⁴ We therefore propose to unify the somewhat confusing nomenclature and spelling of this protein and to refer to *GEC1* (or *GABARAP-L1*) as *GABARAPL1* (GABA_A-receptor-associated protein-like 1).

In this review, we will show that although *GABARAPL1* shares a high sequence homology with other *GABARAP* family members, its expression pattern and regulation differ. Together, these findings suggest that *GABARAPL1* might have essential and specific functions.

The GABARAP Family

GABARAPL1 belongs to the *GABARAP* family, which is one of 2 subfamilies of the yeast Atg8 (autophagy-related 8) ortholog, the other being the MAP-LC3s (consisting of the light-chain of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B and MAP1C, also known as LC3A, LC3B and LC3C). The *GABARAP* family comprises *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2*/GATE-16 (*GABARAP*-like 2/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) (Fig. 1). *GABARAPL1* shows 87% identity with *GABARAP* and 61% identity with GATE-16^{5,6} and also shares a distant homology with LC3A (30.8% identity), LC3B (29% identity) and LC3C (35.8% identity).⁷⁻¹⁰ Members of the *GABARAP* and LC3 families are composed of 117 to 145 amino acids and all possess a conserved C-terminal glycine, essential for their role in autophagy (Fig. 1).^{11,12} In addition to their sequence similarity, the crystal structures of *GABARAP*,¹³⁻¹⁷ GATE-16,⁶ LC3,¹⁸ and

*Correspondence to: Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr
Submitted: 12/18/10; Revised: 04/05/11; Accepted: 04/18/11
DOI:

GABARAPL1	MKFQYKEDHPFEYRKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLDRKRYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLDDKKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLERHRCVESAKIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGKAAVDPADRCKEVQQIRDQHPSKI PVI IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKI PVI IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKI PVVVERYPRETFLPPLDKTKFLVPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKRKAESERADRPFKNRIPVICEK-AEKSDIPEIDKRYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESVMYGL-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESVMYGL-117
GABARAPL2	MWIIRKRIQLPSEKATFLFVD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYSAGENTFGF-117
LC3A	VKIIRRLQLNPTQAFLLVNHQSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYVMVYASQETFGF-125
LC3B	IKIIRRLQLNANQAFLLVNHGSMVSVSTPISEVYSEKDEDGFLYVMVYASQETFGMKLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVLRATEAFYLLVNNKSLVMSATMAEIRDYKDEDGFVMTYASQETFGCLESAAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRIMLPPEKAIIFIFVN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFLYVTVSYAGENTFGR-117

Figure 1. Alignment of the GABARAP and LC3 family members. Amino acid sequences (obtained from NCBI or GeneBank databases) of GABARAPL1 (NP_113600), GABARAP (CAG47031), GABARAPL2 (NP_009216), LC3A (NP_852610), LC3B (NP_073729), LC3C (NP_001004343) and Atg8 (NP_009475) proteins were aligned using the NCBI Protein BLAST tool. The amino acids that differ from those present in GABARAPL1 are indicated in red. The terminal glycine (position 116, 120 or 124), which is essential for conjugation to phospholipids, is displayed in blue.

GABARAPL1 (Structural Genomic Consortium, code: 2R2Q) are also highly similar. It is also worth mentioning that the GABARAPL1 protein sequence is highly conserved throughout evolution from plants to mammals (100% identity) suggesting that this protein plays an essential role in these organisms.^{4,7}

Regulation and Expression of the GABARAPL1 Gene

GABARAPL1 mRNA is expressed in a variety of tissues within the mouse, rat and human. The highest expression levels were initially observed in the brain, heart, liver, skeletal muscle, kidney, spleen, ovary, small intestine, placenta and peripheral blood leukocytes.^{4,7,19} In contrast to its differential expression in adult human tissues, *GABARAPL1* is present at comparable mRNA levels in all fetal tissues.²⁰

Regulation by estrogen. The human and guinea pig *GABARAPL1* cDNA consist of 1,959 and 1,921 nucleotides, respectively. Their coding sequences are composed of 351 nucleotides, which share 93% identity and translate into the exact same protein. The guinea-pig *Gabarapl1* gene has a full-length ERE sequence (estrogen responsive element, reviewed in ref. 21) that is located in the first exon and described as the primary response element necessary for gene activation by Estradiol-17 β (E₂) via ER α (estrogen receptor α).²²

Sequence analysis of the human *GABARAPL1* gene (on chromosome 12) by the MatInspector program from Genomatix²³ or the Cister software²⁴ reveals the presence of several possible regulatory sequences such as ERE, SP-1 (Specificity Protein-1) and AP-1 (Activator Protein-1), to which estrogen receptors could bind (Fig. 2).^{25,26} However, the precise functions of these sequences have not yet been determined.

In contrast, analysis of the DNA sequences of *GABARAP* (on chromosome 17), *GABARAPL2* (on chromosome 16) and

LC3A, *B* and *C* (on chromosomes 20, 16 and 1, respectively) did not indicate the presence of any ERE in the 1,200 bp region upstream of the initial start codon. Indeed, no other *GABARAP* or *LC3* family member has been shown to be upregulated by estrogen as is the case for *GABARAPL1*. This specific regulation of the *GABARAPL1* gene by estrogen might indicate that it exerts particular functions in tissues or pathologies in which estrogens play a major role such as breast cancer or Parkinson disease as discussed further below.

Expression in the central nervous system. Real-time RT-PCR experiments performed on mRNA from male rat cerebral extractions showed that *Gabarapl1* displays the highest expression levels followed by *Lc3*, *Gabarap* and *Gabarapl2*.²⁷ Transcript expression levels of each member, however, differ depending on the specific region of the brain. *Gabarapl1* mRNA is the most highly expressed in all regions of the brain examined and its expression is the highest in the pons and diencephalon (thalamus and hypothalamus).²⁷ These results were confirmed in the adult rat using in situ hybridization experiments, which showed that *Gabarapl1* is indeed widely expressed in the brain, most likely exclusively within neurons, ranging from the olfactory bulb to the brain stem and spinal cord.²⁸ More specifically, *Gabarapl1* appears to be expressed more predominantly in neurons that are involved in somatomotor and neuroendocrine functions and to a lesser extent in sensory and reticular structures.²⁸ *Gabarapl1* is also highly expressed in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons,^{29,30} a neuronal population that is regulated by estrogen. Indeed, estrogen receptors are highly expressed in the hypothalamus^{21,29} and play a major role in the regulation of the reproductive axis through their control on the release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone at the anterior pituitary. Moreover, the primary neurotransmitter inputs to these neurons are GABA_A and glutamate, which exert their effects in the neurons through GABA_A receptors

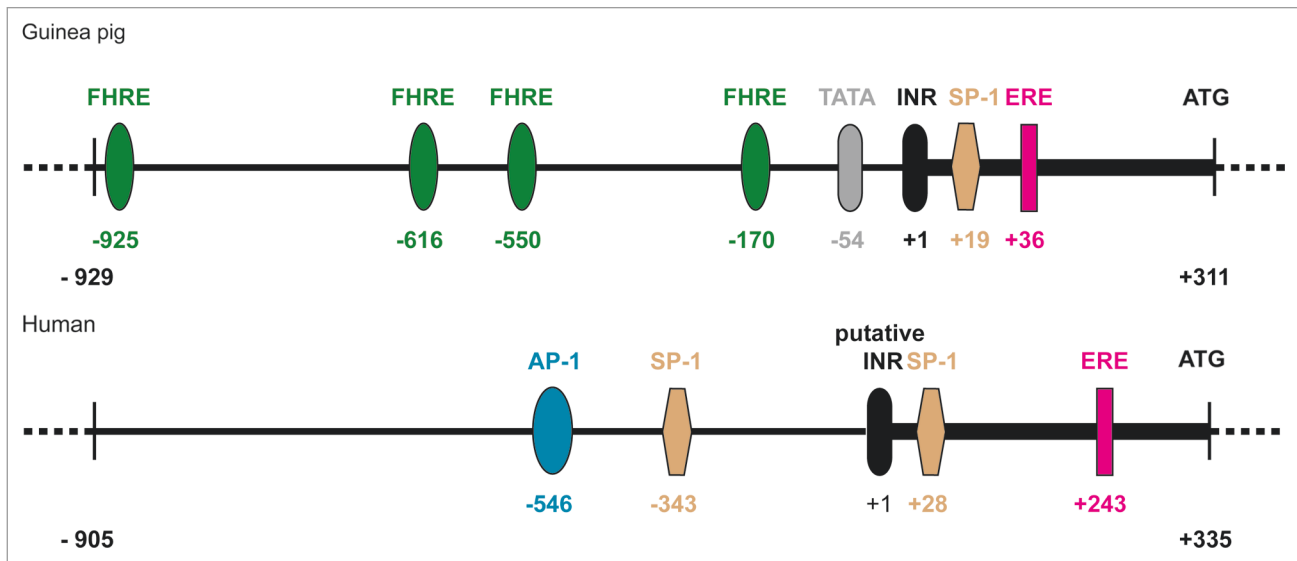


Figure 2. Comparison of the human and guinea pig *GABARAPL1* gene promoter regions. Predictive computer analysis was conducted on promoter sequences. In the guinea pig gene, the INR element is sufficient to direct transcription and the ERE located in the first exon permits induction of the gene by Estradiol-17 β via ER α .⁴ These sequences are conserved in the human gene but their roles have not yet been addressed. A similar analysis of the equivalent region for the *GABARAP* gene revealed no estrogen responsive cis-regulatory sequences. AP-1: binding site of the Activator Protein-1; SP-1: binding site of the transcription factor Specificity Protein-1; ERE: Estrogen Response Element; FHRE: ForkHead Responsive Element; INR: transcription initiator element; TATA: TATA box; Atg: translation initiation codon. Cister and Matinspector softwares were used to predict the presence of estrogen response cis-regulatory sequences.^{23,24} Only sequences identified by both software programs are represented in the figure. Matinspector software was used to predict FHRE.

and glutamate receptors, respectively.^{31,32} As an estrogen-regulated gene, *Gabarap1l* may play a role in the responsiveness of GnRH neurons to estrogen through its implication in GABA_A trafficking to the plasma membrane.

Regulation by circadian rhythms. In mammals, the central pacemaker in the hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the intracellular oscillation generators within several peripheral organs all work together to generate circadian oscillation.^{33,34} Two separate studies have shown that *Gabarap1l* expression varies depending on the day/night rhythms.^{30,35} The first study showed that *Gabarap1l* expression peaks halfway through the light phase of a 24-h cycle (12 h light/12 h dark) in mouse liver.³⁵ The second study demonstrated that *Gabarap1l* expression is temporally related to the oscillations of Circadian Locomotor Output Cycle Kaput (Clock) transcription factors and dependent on *Period 1* (*Per1*) expression in GnV-3 cells (conditionally immortalized gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons from rat).³⁰ Among the *Gabarap* and *Lc3* family members, *Gabarap1l* is the only gene identified thus far to be regulated by circadian rhythms.

Several recent publications have hypothesized a relationship between autophagy and circadian rhythms, although the mechanism is not yet determined (reviewed in ref. 36). It has been shown that the autophagy-related genes *Vps4b* and *Bnip3*, like *Gabarap1l*, undergo rhythmic variations. *Gabarap1l* may, therefore, be regulated by *Per1* in order to participate or regulate autophagy during the diurnal cycle. Moreover, unlike the studies done on *Vps4b* and *Bnip3*,³⁷ *Gabarap1l*'s rhythmic expression was demonstrated in vitro, suggesting that autophagic activity may vary intrinsically in the cell, independent of the circadian pattern

of the whole animal. This finding may indicate that *Gabarap1l* is particularly important for the specific autophagic degradation of unwanted proteins in the cell and not just involved in nutrient recycling, a hypothesis that will require further examination.

Regulation by the FoxO transcription factor family. Several groups have demonstrated that *Gabarap1l* is regulated by FoxO transcription factors. For instance, Sengupta and colleagues found that, in primary cultures of both cardiomyocytes from neonatal rats and mouse heart tissue, stress conditions, such as glucose deprivation or oxidative stress, cause the translocation of FoxO1 and FoxO3 to the nucleus, where they activate autophagy-related genes (*Gabarap1l*, *Atg12* and *Lc3*) and a *FoxO1/FoxO3* conditional double-knockout mouse displays reduced expression of *Gabarap1l* and *Lc3-II* following ischemia/reperfusion injury.^{38,39} Another study indicated that the effects of insulin suppression on autophagy are mediated by a FoxO1-dependent transcription of genes implicated in autophagy (*Gabarap1l*, *Atg12* and *Vps34*).⁴⁰ Furthermore, *Gabarap1l* as well as several other genes implicated in either the process or the regulation of autophagy (*Bnip3*, *Bnip3l*, *Vps34*, *Lc3*, *Atg12*, *Beclin 1* and *Atg4B*) are upregulated in a model of muscle atrophy in vivo.^{41,42} A recent study linked FoxO, AMPK and p38 α in colorectal cancer cells (CRC) during stress-response. In this study, the authors used an inhibitor of p38 α (SB20219) to study the expression of FoxO3A target genes and demonstrated that, of the genes involved in autophagy, *GABARAPL1* shows the highest transcriptional induction after treatment and accumulates in autolysosomes.⁴³

Three FoxO target consensus sequences are located upstream of the promoter region in the mouse *Gabarap1l* gene⁴⁴ and

4 potential FoxO binding sites are present in the guinea pig gene (Fig. 2). While no FoxO binding sites are found in the human gene within the homologous region, they are present further upstream (2–3 kb respective to the start codon) in the human gene. Interestingly, even if *GABARAPL1* is not the only member of the *GABARAP* family found to be regulated by FoxO transcription factors, it is regulated by several FoxO transcription factors and in different physiological processes such as muscle atrophy or colorectal cancer, therefore demonstrating its wide range of action.

Expression and localization of the GABARAPL1 protein. As the protein sequences among the *GABARAP* family members, and in particular between *GABARAP* and *GABARAPL1*, share a high identity, a detailed analysis of their differential expression has been limited. To avoid the use of nonspecific antibodies, research efforts have focused on the analysis of *GABARAPL1* mRNA expression since mRNA probes, complementary to the 3'-untranslated region of the gene, are able to specifically identify *GABARAPL1*.

Despite the lack of a *GABARAPL1*-specific antibody,^{27,28,45} some tissue expression analysis has been performed. High levels of *GABARAPL1* have been found in the brain, in neurons but not in glial cells, and in the lungs.⁴⁶ In addition, *GABARAPL1* protein levels decrease in the failing human heart after mechanical unloading, possibly due to a decreased demand in energy from the heart during this process.⁴⁷ Nevertheless, it is important to point out that it cannot be excluded that, in these studies, several members of the *GABARAP* family have been detected and not only *GABARAPL1*.

Cell lines that stably express *GABARAPL1* linked to a fluorescent tag have also been utilized for protein expression experiments. These studies have shown that the cellular distribution of *GABARAPL1* is highly variable, including the cytoplasm, Golgi complex, endoplasmic reticulum or the plasma membrane, but with a common feature, a staining linked to intracytoplasmic vesicles that can partially colocalize with autophagosomes or lysosomes.^{45,46,48,49} Although these experiments make it possible to determine the expression pattern of exogenous *GABARAPL1*, the cellular distribution of endogenous *GABARAPL1* remains to be confirmed.

Taken together these data show that *GABARAPL1* displays a specific regulation (estrogens and circadian rhythms) not shared by the other members of the *GABARAP* and *LC3* families. This regulation might allow the investigators to use specific inducers targeting only one member of these families. Nevertheless, several points will need to be addressed in the future: Do the differences observed at the mRNA level reflect differences at the protein level? Is this specific regulation linked to any cellular process, such as autophagy, or pathologies, such as cancer and neurodegenerative disease?

The Role of GABARAPL1 in Neuronal Signal Transmission

GABA_A receptors are ligand-gated chloride ion channels found at neuronal synapses and are responsible for the majority of the

fast inhibitory transmission in the brain.^{50,51} They are involved in many different physiological processes such as anxiety, circadian rhythm, memory, learning, controlling excitability of the brain, synaptic plasticity and synaptogenesis.⁵² It has been recently demonstrated that Gabarap11 interacts with tubulin and the $\gamma 2$ subunit of the GABA_A receptor and is able to promote tubulin polymerization and bundling to form microtubules.^{45,49,53} A similar role for the Gabarap protein has also been previously demonstrated, suggesting that the 2 proteins are redundant with regard to this function.^{3,54}

This idea has been confirmed with the creation of the *Gabarap* knockout mouse.⁵⁵ These mice lack a phenotype, they do not display any change in localization or number of GABA_A receptors, nor are Gabarap11 or Gabarap12 protein levels upregulated. siRNA knockdown of *Gabarap* in primary hippocampal neurons also gave similar results.⁵⁶ A double-knockout mouse of both *Gabarap* and *Gabarap11* will therefore be essential in order to evaluate their collective role and to determine the role of the third member of the family, *Gabarap12*, has in the transport of GABA_A receptors in vivo.

Interestingly, N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) was also identified as a Gabarap11 binding partner in rat brain extracts and Chinese hamster ovary cells.⁴⁵ Although the relevance of the Gabarap11/NSF interaction has not yet been elucidated, it is likely that this complex will be involved in the trafficking of neuronal receptors as it has been described for the Gabarap/NSF and Gabarap12/NSF complexes.^{5,57}

Another protein partner of Gabarap11 is the kappa opioid receptor (KOR), which is a member of the G-protein coupled receptor family.⁴⁵ Immunocytochemical studies show that Gabarap11 colocalizes with the KOR in the endoplasmic reticulum and Golgi where it appears to increase the number of cell-surface receptors.⁴⁵ KOR/Gabarap11 binding involves hydrophobic interactions⁵³ and the Gabarap11 residues that are responsible for these interactions are highly conserved in Gabarap and Gabarap12. However, compared with Gabarap11, Gabarap and Gabarap12 affect the transport of the KOR to a lesser extent. Moreover, Gabarap11 displays a higher affinity for KOR and, unlike Gabarap, can associate with and enhance the expression of this receptor without being processed at its G116 residue and associated to membranes.⁵⁸ These data suggest a different role of these proteins in the transport of the kappa opioid receptor. The residues within the opioid receptor that are necessary for Gabarap11 interaction are located within a FPXXM motif at its C terminus. This motif is also present in the GluR1 (glutamate receptor type 1) subunit of the AMPA receptor and in the prostaglandin receptor EP3.f. The expression of these receptors is increased as a result of Gabarap11 overexpression, suggesting that Gabarap11 has a role that is more complex than merely in receptor transport.⁵³ Indeed, the authors of the previous study suggest that Gabarap11 might act as a chaperone for the KOR and possibly other proteins.

The Role of GABARAPL1 in Autophagy

Autophagy is a highly catabolic process leading to the degradation of cytoplasmic components and sometimes also the degradation

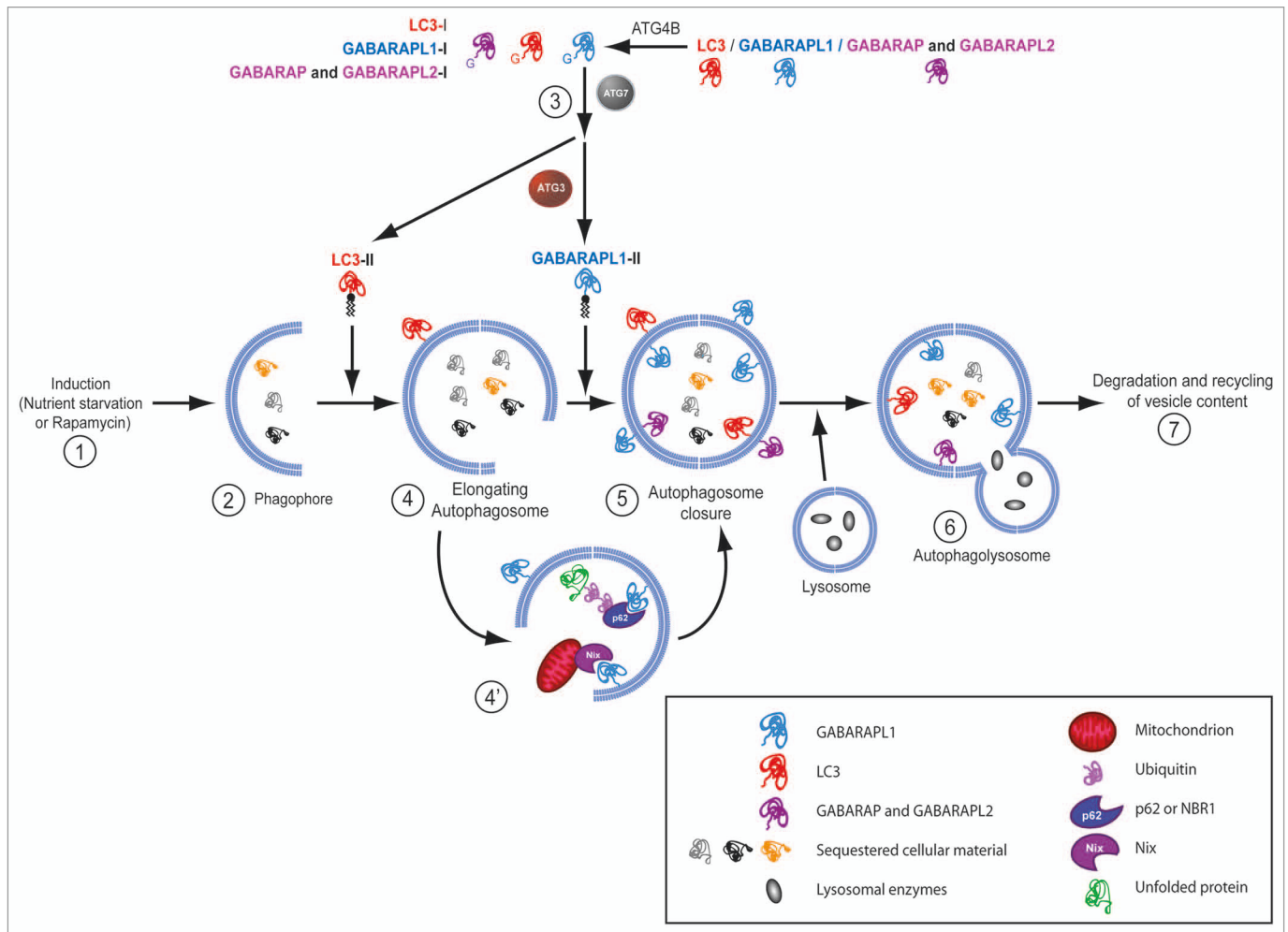


Figure 3. Role of GABARAPL1 in autophagy. GABARAP, GABARAPL2 and LC3 are cleaved in the cell by Atg4 enzymes to produce their mature forms; GABARAPL1-I, GABARAP-I, GABARAPL2-I and LC3-I. Under autophagy-inducing conditions (e.g., stimulation with rapamycin or nutrient starvation) (1), nucleation of phagophores is initiated (2) and followed by elongation of the pre-autophagosomal membrane, which leads to the creation of autophagosomes. During this process, GABARAPL1-I, GABARAP-I, GABARAPL2-I and LC3-I are conjugated to phospholipids by Atg7 and Atg3 (3) to produce the phospholipid-linked forms GABARAPL1-II, GABARAP-II, GABARAPL2-II and LC3-II. LC3-II is essential for elongation of autophagosomes (4), whereas GABARAP-II, GABARAPL1-II and GABARAPL2-II are required for the closure of autophagosomes (5). Autophagosomes then undergo maturation into autophagolysosomes (6), resulting in the degradation of their content and the recycling of the breakdown products (7). GABARAPL1 is also involved in selective autophagy through its interaction with cargo adaptor proteins, such as Nix, p62 or NBR1, to activate the clearance of specific unwanted proteins or organelles (4').

of the cell as a whole. It has been implicated in many biological processes from development to disease states (reviewed in ref. 59 and 60). Numerous recent studies have focused on elucidating the molecular mechanism of this process and it is now known that the elongation of the phagophore is regulated by 2 conjugation systems.⁶¹ The first system involves the conjugation of Atg12 to Atg5 by the Atg7 and Atg10 enzymes. The second involves the conjugation of the LC3 protein onto phosphatidylethanolamine by the Atg7 and Atg3 enzymes (reviewed in ref. 62). Before conjugation, the precursor form of LC3 is cleaved by the cysteine protease Atg4B, a member of the Atg4 family of endopeptidases, to expose a glycine residue at its C terminus (Fig. 1). The mature LC3 is then attached to its target phospholipid, typically a phosphatidylethanolamine on the forming autophagosomal structure in vitro and in vivo (Fig. 3), or even a phosphatidylserine in vitro.

This difference is thought to be governed by yet unidentified 'selective factors' that are only present in vivo.⁶³

Recently, Gabarapl1 has been described as a new marker of autophagosomes⁴⁸ and can be cleaved by Atg4B in vitro, a maturation step described to be inhibited in *Atg4B*^{-/-} mice.^{48,64,65} The loss of the maturation of the Gabarap family members by Atg4B in this in vivo model leads to balance disorders owing to a loss of autophagic function within the inner ear. Another recent study shows that the proteins of the Atg8 family are involved in the formation of the autophagosomes but display different and specific function during this process: the LC3 family is necessary for the elongation of the phagophore, whereas the GABARAP family is implicated in later stages of the formation of the autophagosome.⁶⁶

One main question remains: What is the specificity of function of the GABARAP and LC3 family members in autophagy?

Deletion of *Gabarap* does not result in an increased expression of *Gabarapl1* or *Gabarapl2*.⁵⁵ Similarly, *Lc3 β* knockout mice do not display a compensation of *Lc3 α* or *Gabarap* expression.⁶⁷ As such, one could assume that the members of each subfamily are simply redundant. Nevertheless, given their specific expression patterns, their role in autophagy might be tissue or cell specific or linked to specific types of autophagy such as selective autophagy as described below.

The Role of GABARAPL1 in Selective Autophagy

The autophagic pathway has evolved to include more specific processes in which certain autophagic targets are selected via autophagic receptors such as sequestosome1 (SQSTM1, also known as p62) or neighbor of Brca1 (NBR1).⁶⁸⁻⁷⁰ These proteins act as cargo adapters and connect the ubiquitinated target proteins, protein aggregates or damaged organelles to the autophagosome-linked GABARAP and LC3 family members. They do so by binding both the cargo (i.e., the material to be sequestered) via their C-terminal ubiquitin-associated domain (UBA)⁷¹ and the LC3 or GABARAP family members via their LC3-interacting domain (LIR).⁶⁹ Indeed, GABARAPL1 interacts with both p62 and NBR1,^{69,72,73} and the interaction between GABARAPL1 and p62 facilitates the autophagy of ubiquitinated protein aggregates.⁶⁹ GABARAPL1 is also thought to be involved in mitophagy through its interaction with the mitochondria-associated protein NIX1 and its recruitment to damaged mitochondria in vitro.⁷⁴ It is therefore likely that GABARAPL1 constitutes a protein target for cargo adapters and thus is necessary for the degradation of unwanted organelles or protein aggregates, a function that could prove to be useful for the therapy of various diseases, such as cancer or neurodegeneration. Therefore, it will be of great interest in the future to determine whether the GABARAP and LC3 family members play redundant roles in this process or are involved in the degradation of different targets that are associated with specific pathologies, such as α -synuclein in Parkinson disease⁷⁵ or p62 in cancer.⁷⁶

The Role of GABARAPL1 in Cancer

The first evidence for a potential role of GABARAPL1 and GABARAP in cancer was a study that described reduced *GABARAPL1* expression in different cancerous cell lines compared with normal tissues.¹⁹ More recently, we investigated *GABARAPL1* expression in a large cohort of breast adenocarcinoma (265 samples)⁷⁷ and demonstrated that those patients who presented with high *GABARAPL1* expression levels had a lower risk of metastasis, specifically for lymph node-positive patients. Moreover, decreased *GABARAPL1* expression correlates with clinic-pathological features such as the histological grade of a given tumor. Reduced levels of *GABARAPL1* mRNA are observed in tumors of high histological grade, with lymph node-positive and estrogen- and/or progesterone receptor-negative status. These results suggest a role for *GABARAPL1* as a prognostic marker in breast cancer, specifically in lymph node-positive patients. Like *GABARAPL1*, *GABARAP* expression is also diminished in

breast cancer cell lines, both at the mRNA and protein levels.⁷⁸ *GABARAP* also has a role in other cancers as *GABARAP* transcript expression correlates with a better survival rate for patients affected by neuroblastoma,⁷⁹ and *GABARAP* protein expression is significantly upregulated in colorectal cancer.⁸⁰

Autophagy has been described to play a paradoxical role in tumor apparition and progression. Early in the process of tumorigenesis, autophagy prevents tumor progression by degrading damaged organelles such as mitochondria, which would otherwise be stressors in the cell.^{81,82} Under metabolic stress, and at later stages of tumorigenesis, however, some tumors exploit their autophagic capabilities in order to provide themselves with the necessary nutrients to survive (reviewed in ref. 83–85). Later on, autophagy is also responsible for the development of drug resistance in many cancers.⁸⁶ Since GABARAPL1 is regulated by estrogens, and its gene expression is a good prognostic indicator for breast cancer patients,⁷⁷ it has a tremendous potential as a therapeutic target against cancer. In fact, anti-estrogen treatments (tamoxifen) are currently being combined with an inhibitor of autophagy (chloroquine) in clinical trials to treat breast cancer.⁸⁶

The Role of GABARAPL1 in Neurodegeneration

In the last decade, there has been a growing body of evidence that supports a role for autophagy in the protection against unwanted protein aggregates in the brain. Anomalies in the autophagic process have been discovered in many neurodegenerative diseases including, but certainly not limited to, Alzheimer, Huntington and Parkinson diseases (reviewed in ref. 87). As discussed above, GABARAPL1 interacts with the autophagy cargo adaptors p62 and NBR1, which bind to ubiquitinated protein aggregates to identify them for degradation.⁶⁸⁻⁷⁰

However, GABARAPL1 not only binds to these autophagy cargo adaptors, but also confers an affinity for those mutated proteins that form aggregates in neurodegenerative diseases, such as α -synuclein oligomers in Parkinson disease.⁸⁸ Moreover, *Gabarapl1* mRNA is highly expressed in the *substantia nigra pars compacta* (*SNpc*), the region of the *SN* that consists of dopaminergic neurons, implicated in the progression of Parkinson disease, whereas its expression is lacking in the *pars reticularis*.²⁸ Two recent microarray analysis showed that *GABARAPL1* expression, but not *GABARAP* or *LC3*, is significantly reduced in the prefrontal cortex of macaque monkeys in an MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) experimental model of Parkinson disease,⁸⁹ and highly downregulated in laser microdissected dopaminergic neurons (DA) of the *SNpc* of Parkinson disease patients.⁹⁰ The latter observation might indicate a need for a decreased autophagic activity, by means of the degradation of *GABARAPL1* and/or other autophagy proteins, in order for these neurodegenerative diseases to progress, further suggesting the importance of GABARAPL1 in the prevention of neurodegenerative diseases.

It is worth noting that sex steroids, in particular estrogens, have a protective effect in various models of brain injury and, in particular, in a MPTP-murine model of Parkinson disease.⁹¹ Since estrogens regulate *GABARAPL1* transcription, the GABARAPL1 protein may be one of the links between estrogen

Table 1. List of confirmed GABARAPL1-interacting partners

GABARAPL1-interacting partners	Potential significance of the interaction	References
<i>GABARAPL1-specific partners</i>		
ARH (Autosomal recessive hypercholesterolemia)	Intracellular transport, outgrowth and elongation of axons	Mameza <i>et al.</i> , 2007
α-synuclein	Protein aggregates degradation in neurodegenerative diseases	Schnack <i>et al.</i> , 2008
<i>Partners common with one or more GABARAP-family members</i>		
GABA_AR (Gamma-aminobutyric acid type A receptor)	Transport of the GABA _A receptor to plasma membranes	Mansuy <i>et al.</i> , 2004
Tubulin	Tubulin assembly, microtubules bundling, transport of GABA _A receptor <i>via</i> microtubules	Mansuy <i>et al.</i> , 2004
KOR (Kappa opioid receptor)	Transport of KOR from ER/Golgi to plasma membranes	Chen <i>et al.</i> , 2006
NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor)	Intracellular transport, membrane fusion events	Chen <i>et al.</i> , 2006
PX-RICS	Transport of the N-cadherin/ β -catenin complex from ER to Golgi	Nakamura <i>et al.</i> , 2008
Stbd1 (Starch binding domain containing protein 1/genethonin 1)	Vesicular transfer of glycogen to the lysosome	Jiang <i>et al.</i> , 2010
p62/SQSTM1 (sequestosome 1)	Degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy	Rual <i>et al.</i> , 2005; Pankiv <i>et al.</i> , 2007
Nbr1 (Neighbor of Brca1)	Degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy	Larsen <i>et al.</i> , 2010
Nix	Clearance of damaged mitochondria by mitophagy	Novak <i>et al.</i> , 2010

and neuroprotection. If this is indeed the case, it might constitute an attractive therapeutic target in the future.

Other Functions of GABARAPL1

GABARAPL1 mRNA expression is upregulated in peripheral blood mononuclear cells from chronic fatigue syndrome

patients compared with normal blood donors.⁹² GABARAPL1 is the only member of the GABARAP family that has been shown to interact with the autosomal recessive hypercholesterolemia protein⁹³ in the brain. Lastly, GABARAPL1 interacts with the starch binding domain-containing protein 1, a protein thought to play a role in glycogen metabolism (Table 1).^{94,95}

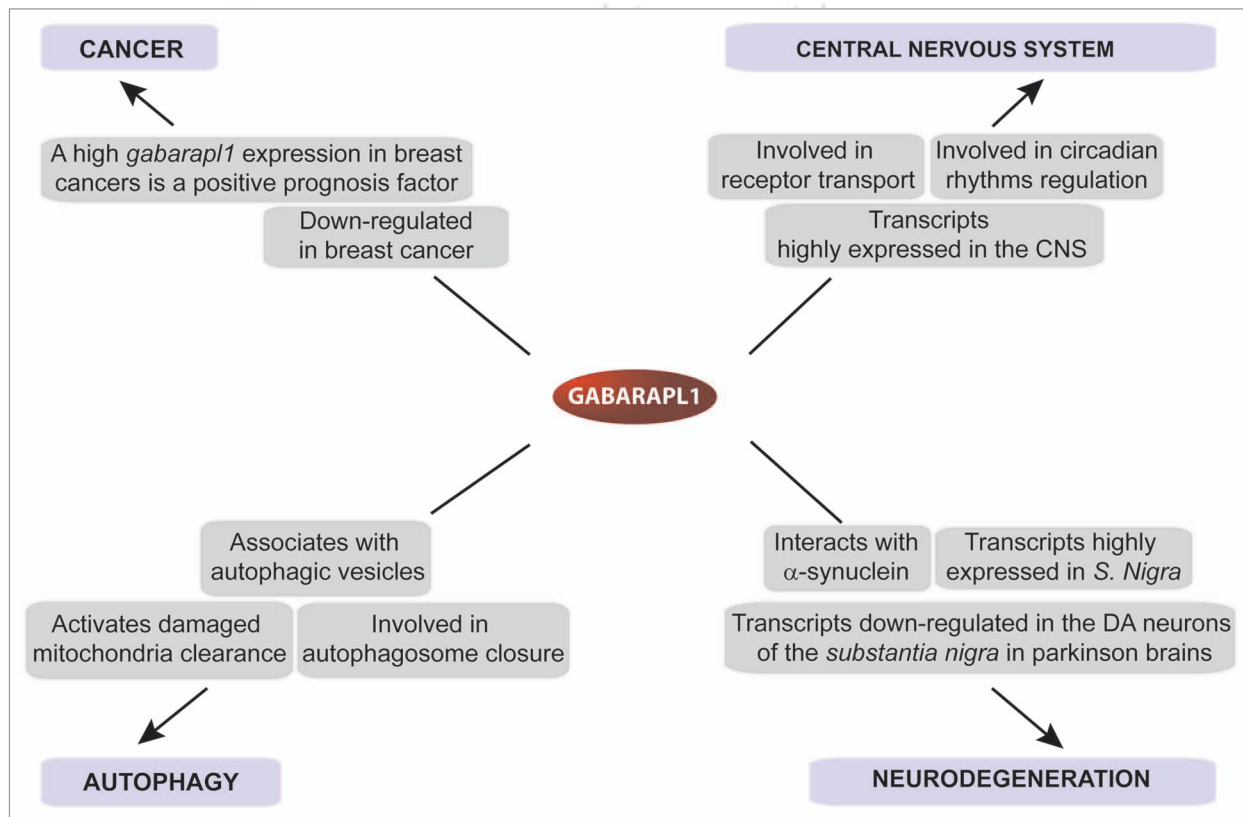


Figure 4. Confirmed and putative roles of GABARAPL1. Schematic illustration of described or putative roles for GABARAPL1 and regulation of *Gab-arapl1* gene and GABARAPL1 protein in physiological processes or pathologies.

Conclusion

GABARAPL1, like GABARAP, is implicated in several different cellular processes and presents a specific regulation including the estrogen hormones, the FOXO family and the circadian rhythms. Moreover, it is differentially regulated in various pathologies, such as breast cancer, colorectal cancer, neurodegenerative models and chronic fatigue syndrome (Fig. 4).

Together, these data suggest an essential and specific role for this protein that is distinct from that of its closest homolog, GABARAP. At the molecular and cellular levels, the main question to address will be the specificity of their protein partners: are they identical for all the members of the family or are they specific to different pathologies? The necessary studies to answer these questions, however, will require a specific antibody to further characterize the interaction of GABARAPL1 with its protein partners. The therapeutic potential of GABARAPL1 looks promising since this protein displays a specific regulation that is

not shared by the other members of the GABARAP family. In particular, GABARAPL1 might prove a useful therapeutic target for estrogen responsive cancers and in neurodegenerative diseases. The example of GABARAPL1 demonstrates the importance to differentiate between the different members of the GABARAP family when studying their role and no longer consider these proteins as being functionally redundant.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Inter Régionale Grand Est), Comité du Doubs. Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn Nicole Le Grand are supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and Stéphanie Seguin is supported by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. Authors are grateful to Dr. Petra Gross for critically reading the manuscript and for editorial suggestions.

References

- Pellerin I, Vuillemoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL. Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 90:17-21; PMID: 8495796; DOI:10.1016/0303-7207(93)90161-C.
- Jouvenot M, Pellerin I, Alkhalaf M, Marechal G, Royez M, Adessi GL. Effects of 17beta-estradiol and growth factors on c-fos gene expression in endometrial epithelial cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 72:149-57; PMID: 2127027; DOI:10.1016/0303-7207(90)90139-Y.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA_A-receptor-associated protein links GABA_A receptors and the cytoskeleton. *Nature* 1999; 397:69-72; PMID: 9892355; DOI:10.1038/16264.
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, et al. A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25; PMID: 11374880; DOI:10.1006/bbrc.2001.4908.
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* 2000; 19:1494-504; PMID: 10747018; DOI:10.1093/emboj/19.7.1494.
- Paz Y, Elazar Z, Fass D. Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Atg7p. *J Biol Chem* 2000; 275:25445-50; PMID: 10856287; DOI:10.1074/jbc.C000307200.
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, et al. Cloning, expression patterns and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA_A receptor-associated protein. *Genomics* 2001; 74:408-13; PMID: 11414770; DOI:10.1006/geno.2001.6555.
- Mann SS, Hammarback JA. Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A(MAP1A) and MAP1B. *J Neurosci Res* 1996; 43:535-44; PMID: 8833088; DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<535::AID-JNR3>3.0.CO;2-J.
- Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* 1994; 269:11492-7; PMID: 7908909.
- Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8; PMID: 11060023; DOI:10.1093/emboj/19.21.5720.
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:1-11; PMID: 20431342; DOI:10.4161/auto.6.4.11819.
- Tanida I, Sou YS, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3. *FEBS J* 2006; 273:2553-62; PMID: 16704426; DOI:10.1111/j.1742-4658.2006.05260.x.
- Knight D, Harris R, McAlister MS, Phelan JP, Geddes S, Moss SJ, et al. The X-ray crystal structure and putative ligand-derived peptide binding properties of gamma-aminobutyric acid receptor type A receptor-associated protein. *J Biol Chem* 2002; 277:5556-61; PMID: 11729197; DOI:10.1074/jbc.M109753200.
- Bavro VN, Sola M, Bracher A, Kneussel M, Betz H, Weissenhorn W. Crystal structure of the GABA_A-receptor-associated protein, GABARAP. *EMBO Rep* 2002; 3:183-9; PMID: 11818336; DOI:10.1093/embo-reports/kvf026.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB. Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA_A receptor localization and tubulin binding. *Neuron* 2002; 33:63-74; PMID: 11779480; DOI:10.1016/S0896-6273(01)00558-X.
- Stangler T, Mayr LM, Willbold D. Solution structure of human GABA_A receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation. *J Biol Chem* 2002; 277:13363-6; PMID: 11875056; DOI:10.1074/jbc.C200050200.
- Kouno T, Miura K, Kanematsu T, Shirakawa M, Hirata M, Kawano K. 1H, 13C and 15N resonance assignments of GABARAP, GABA_A receptor associated protein. *J Biomol NMR* 2002; 22:97-8; PMID: 11885988; DOI:10.1023/A:1013884402033.
- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* 2004; 9:611-8; PMID: 15265004; DOI:10.1111/j.1356-9597.2004.00750.x.
- Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Expression of *gec1/GABARAPL1* versus GABARAP mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 119:216-9; PMID: 14625090; DOI:10.1016/j.molbrainres.2003.09.011.
- Kusama Y, Sato K, Kimura N, Mitamura J, Ohdaira H, Yoshida K. Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis* 2009; 14:1165-75; PMID: 19657746; DOI:10.1007/s10495-009-0390-2.
- Eyigor O, Lin W, Jennes L. Identification of neurones in the female rat hypothalamus that express oestrogen receptor-alpha and vesicular glutamate transporter-2. *J Neuroendocrinol* 2004; 16:26-31; PMID: 14962072; DOI:10.1111/j.1365-2826.2004.01109.x.
- Vernier-Magnin S, Nemos C, Mansuy V, Tolle F, Guichard L, Delage-Mourroux R, et al. Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1/GABARAPL1* gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1731:23-31; PMID: 16153720; DOI:10.1016/j.bbexp.2005.05.002.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21:2933-42; PMID: 15860560; DOI:10.1093/bioinformatics/bti473.
- Frith MC, Hansen U, Weng Z. Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* 2001; 17:878-89; PMID: 11673232; DOI:10.1093/bioinformatics/17.10.878.
- Wu-Peng XS, Pugliese TE, Dickerman HW, Pentecost BT. Delineation of sites mediating estrogen regulation of the rat creatine kinase B gene. *Mol Endocrinol* 1992; 6:231-40; PMID: 1569966; DOI:10.1210/me.6.2.231.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiao AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74:311-7; PMID: 11162939; DOI:10.1016/S0960-0760(00)00108-4.
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of *gabarp*, *gec1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1073:83-7; PMID: 16458273; DOI:10.1016/j.brainres.2005.11.004.

28. Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, et al. Specific regional distribution of *gac1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15; PMID: 18423580; DOI:10.1016/j.brainres.2008.02.077.
29. Malyala A, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids* 2005; 70:397-406; PMID: 15862823; DOI:10.1016/j.steroids.2005.03.004.
30. Mansuy V, Risold PY, Glauser M, Fraichard A, Pralong FP. Expression of the GABA_A receptor associated protein *Gec1* is circadian and dependent upon the cellular clock machinery in GnRH secreting GnV-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 307:68-76; PMID: 19524128; DOI:10.1016/j.mce.2009.02.029.
31. Chu Z, Moenter SM. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors modulates GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons and alters their firing rate: a possible local feedback circuit. *J Neurosci* 2005; 25:5740-9; PMID: 15958740; DOI:10.1523/JNEUROSCI.0913-05.2005.
32. Leranthe C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanbrough M, Naftolin F. Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 1985; 40:536-9; PMID: 3892354; DOI:10.1159/000124127.
33. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-41; PMID: 12198538; DOI:10.1038/nature00965.
34. Ripperger JA, Schibler U. Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:357-62; PMID: 11343908; DOI:10.1016/S0955-0674(00)00220-9.
35. Sakao E, Ishihara A, Horikawa K, Akiyama M, Arai M, Kato M, et al. Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem* 2003; 278:30450-7; PMID: 12750384; DOI:10.1074/jbc.M304809200.
36. Sachdeva UM, Thompson CB. Diurnal rhythms of autophagy: implications for cell biology and human disease. *Autophagy* 2008; 4:581-9; PMID: 18437053.
37. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109:307-20; PMID: 12015981; DOI:10.1016/S0092-8674(02)00722-5.
38. Sengupta A, Molkenkin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2009; 284:28319-31; PMID: 19696026; DOI:10.1074/jbc.M109.024406.
39. Sengupta A, Molkenkin JD, Paik JH, Depinho RA, Yutzey KE. FoxO Transcription Factors Promote Cardiomyocyte Survival upon Induction of Oxidative Stress. *J Biol Chem* 2011; 286:7468-78; PMID: 21159781; DOI:10.1074/jbc.M110.179242.
40. Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 2009; 284:31484-92; PMID: 19758991; DOI:10.1074/jbc.M109.033936.
41. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 2007; 6:458-71; PMID: 18054315; DOI:10.1016/j.cmet.2007.11.001.
42. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; 18:39-51; PMID: 14718385; DOI:10.1096/fj.03-0610.com.
43. Chiacchiera F, Simone C. Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. *Autophagy* 2009; 5:1030-3; PMID: 19587525; DOI:10.4161/auto.5.7.9252.
44. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 2007; 6:472-83; PMID: 18054316; DOI:10.1016/j.cmet.2007.11.004.
45. Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:7983-93; PMID: 16431922; DOI:10.1074/jbc.M509805200.
46. Wang Y, Dun SL, Huang P, Chen C, Chen Y, Unterwald EM, et al. Distribution and ultrastructural localization of GEC1 in the rat CNS. *Neuroscience* 2006; 140:1265-76; PMID: 16650615; DOI:10.1016/j.neuroscience.2006.03.013.
47. Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, Vela D, Gong M, Salazar R, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* 2009; 120:191-7; PMID: 19752367; DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.842252.
48. Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despoughey G, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:495-505; PMID: 20404487; DOI:10.4161/auto.6.4.11819.
49. Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA_A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48; PMID: 15530441; DOI:10.1016/j.bbrc.2004.10.072.
50. Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17:569-602; PMID: 7516126; DOI:10.1146/annurev.ne.17.030194.003033.
51. Rabow LE, Russek SJ, Farb DH. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* 1995; 21:189-274; PMID: 8578436; DOI:10.1002/syn.890210302.
52. Belhage B, Hansen GH, Elster L, Schousboe A. Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function. *Perspect Dev Neurobiol* 1998; 5:235-46; PMID: 9777639.
53. Chen Y, Chen C, Kotsikou E, Lynch DL, Reggio PH, Liu-Chen LY. GEC1/kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect. *J Biol Chem* 2009; 284:1673-85; PMID: 19001416; DOI:10.1074/jbc.M808303200.
54. Wang H, Olsen RW. Binding of the GABA_A receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAP-GABA_A receptor interaction. *J Neurochem* 2000; 75:644-55; PMID: 10899939; DOI:10.1046/j.1471-4159.2000.0750644.x.
55. O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H. GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* 2005; 22:2644-8; PMID: 16307606; DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04448.x.
56. Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC. NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA_A receptors. *J Neurosci* 2007; 27:14326-37; PMID: 18160640; DOI:10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007.
57. Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, et al. The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA_A receptors. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18:13-25; PMID: 11461150; DOI:10.1006/mcne.2001.1005.
58. Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY. Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* 2011; 286:15106-15; PMID: 21388957; DOI:10.1074/jbc.M111.230896.
59. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298:776-85; PMID: 20089931; DOI:10.1152/ajpcell.00507.2009.
60. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:931-7; PMID: 17712358; DOI:10.1038/nrm2245.
61. Denuc A, Marfany G. SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem Soc Trans* 2010; 38:34-9; PMID: 20074031; DOI:10.1042/BST0380034.
62. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2503-18; PMID: 15325588; DOI:10.1016/j.biocel.2004.05.009.
63. Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP and GATE-16. *J Biol Chem* 2006; 281:3017-24; PMID: 16303767; DOI:10.1074/jbc.M505888200.
64. Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 2009; 122:2554-66; PMID: 19549685; DOI:10.1242/jcs.046250.
65. Marino G, Fernandez AF, Cabrera S, Lundberg YW, Cabanillas R, Rodriguez F, et al. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest* 2010; 120:2331; PMID: 20577052; DOI:10.1172/JCI42601.
66. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010; 29:1792-802; PMID: 20418806; DOI:10.1038/emboj.2010.74.
67. Cann GM, Guignabert C, Ying L, Deshpande N, Bekker JM, Wang L, et al. Developmental expansion of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice. *Dev Dyn* 2008; 237:187-95; PMID: 18069693; DOI:10.1002/dvdy.21392.
68. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 2009; 33:505-16; PMID: 19250911; DOI:10.1016/j.molcel.2009.01.020.
69. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. 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; DOI:10.1074/jbc.M702824200.
70. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 131:1149-63; PMID: 18083104; DOI:10.1016/j.cell.2007.10.035.
71. Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 1996; 271:20235-7; PMID: 8702753; DOI:10.1074/jbc.271.34.20235.
72. Larsen KB, Lamark T, Overvatn A, Harneshaug I, Johansen T, Bjorkoy G. A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1. *Autophagy* 2010; 6:784-93; PMID: 20574168; DOI:10.4161/auto.6.6.12510.
73. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005; 437:1173-8; PMID: 16189514; DOI:10.1038/nature04209.
74. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 2010; 11:45-51; PMID: 20010802; DOI:10.1038/embor.2009.256.

75. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:492-501; PMID: 11433374; DOI:10.1038/35081564.
76. Mathew R, Karp CM, BeauDOIn B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137:1062-75; PMID: 19524509; DOI:10.1016/j.cell.2009.03.048.
77. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1024-31; PMID: 20197771; DOI:10.1038/sj.bjc.6605568.
78. Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, et al. Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:394-400; PMID: 15695379.
79. Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:4127-34; PMID: 15483022; DOI:10.1200/JCO.2004.02.032.
80. Miao Y, Zhang Y, Chen Y, Chen L, Wang F. GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatology* 2004; 39:257-61; PMID: 20583424.
81. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:1524-32; PMID: 19371598; DOI:10.1016/j.bbamcr.2009.01.006.
82. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008; 34:737-49; PMID: 18722718; DOI:10.1016/j.ctrv.2008.07.001.
83. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 2007; 3:28-31; PMID: 16969128.
84. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* 2010; 584:1427-35; PMID: 20035753; DOI:10.1016/j.febslet.2009.12.034.
85. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:1516-23; PMID: 19167434; DOI:10.1016/j.bbamcr.2008.12.013.
86. Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806:220-9; PMID: 20637264.
87. Jaeger PA, Wyss-Coray T. All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* 2009; 4:16; PMID: 19348680; DOI:10.1186/1750-1326-4-16.
88. Schnack C, Danzer KM, Hengerer B, Gillardon F. Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins. *Neuroscience* 2008; 154:1450-7; PMID: 18541383; DOI:10.1016/j.neuroscience.2008.02.049.
89. Storvik M, Arguel MJ, Schmieder S, Delerue-Audegond A, Li Q, Qin C, et al. Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 2010; 38:386-94; PMID: 20206263; DOI:10.1016/j.nbd.2010.02.008.
90. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 2009; 132:1795-809; PMID: 19052140; DOI:10.1093/brain/awn323.
91. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30:142-57; PMID: 19410597; DOI:10.1016/j.yfrne.2009.04.014.
92. Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* 2005; 58:826-32; PMID: 16049284; DOI:10.1136/jcp.2005.025718.
93. Mameza MG, Lockard JM, Zamora E, Hillefors M, Lavina ZS, Kaplan BB. Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions. *J Neurochem* 2007; 103:927-41; PMID: 17727637; DOI:10.1111/j.1471-4159.2007.04854.x.
94. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 2010; 466:68-76; PMID: 20562859; DOI:10.1038/nature09204.
95. Jiang S, Heller B, Tagliabracci VS, Zhai L, Irimia JM, Depaoli-Roach AA, et al. Starch binding domain containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem* 2010; 285:34960-71; PMID: 20810658; DOI: 10.1074/jbc.M110.150839.

Journal Pre-proof
 Do not distribute.

Publication en cours de finalisation.

Publication : « Identification of HSP90 α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein »

Identification of HSP90 α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein

Stéphanie Seguin-Py*, Géraldine Lucchi[†], Sophie Croizier*, Fatima Z. Chakrama*, Gilles Despouy*, Jaclyn N. Le Grand*, Patrick Ducoroy[†], Wilfrid Boireau[‡], Michaël Boyer-Guittaut*, Michèle Jouvenot*, Annick Fraichard*, Régis Delage-Mourroux*.

*Université de Franche-Comté, EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France.

[†]CLIPP CGFL, 1 rue du Professeur Marion, BP 77980 21079 Dijon, France.

[‡]Institut FEMTO-ST, UMR 6174 CNRS, Clinical & Innovation Proteomic Platform (CLIPP), Université de Franche-Comté, 32 avenue de l'Observatoire, 25044 Besançon Cedex, France

Corresponding author: Pr. Régis Delage-Mourroux, Université de Franche-Comté, EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France.

Phone: 0033-3-81-66-66-24

Fax: 0033-3-81-66-69-70

Email : regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr

Key words:

17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) ; GABA_A receptor-protein-like 1 (GABARAPL1) ; glandular epithelial cell 1 (GEC1) ; heat shock protein 90 α/β (HSP90 α/β) ; Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) ; proteasome inhibitors.

Abbreviations used:

17-AAG: 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin, GABA_A : γ -aminobutyric acid, type A, GABA_AR : γ -aminobutyric acid, type A receptor, GABARAP : GABA_A receptor-associated protein, GABARAPL1, GABARAPL2 : GABA_A receptor-protein-like 1 and 2, GATE-16 : golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa, GEC1 : glandular epithelial cell protein 1, GFP: green fluorescent protein, GST : glutathione-S-transferase, HEK293: Human Embryonic Kidney 293, HSP90 α/β : heat shock protein 90 α/β , IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, KOR : kappa opioid receptor, MAP-LC3 : microtubule-associated protein light chain 3, MCF-7 : Michigan cancer foundation-7, NBR1 : neighbour of BRCA1, Nix1/BNIP3L : BNIP3 like protein (BNIP3: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein), NP-40 : nonidet-P40, NSF : N-ethylmaleimide sensitive factor, RIP1: receptor interacting protein 1, UTR : untranslated region.

ABSTRACT

GABARAPL1 belongs to the small family of GABARAP proteins (including GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2/GATE-16), one of the two subfamilies of the yeast Atg8 orthologue. GABARAPL1 is involved in the intracellular transport of receptors, *via* an interaction with tubulin and GABA_A or kappa opioid receptors, and also participates in autophagy and cell proliferation. In the present study, we identify the HSP90 α/β protein as a novel interaction partner for GABARAPL1 using mass spectrometry, GST pull-down and coimmunoprecipitation experiments. GABARAPL1 and HSP90 α/β partially colocalize in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 breast cancer cells and in rat brain. Moreover, treatment of MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells with the HSP90 α/β inhibitor 17-AAG promotes the GABARAPL1 degradation, a process that is blocked by proteasome inhibitors such as MG132, bortezomib and lactacystin. Accordingly, we demonstrate that HSP90 α/β interacts and protects GABARAPL1 from its degradation by the proteasome.

1. INTRODUCTION

The *gabrapl1* (*gabrap like-1*) gene was originally discovered in our laboratory as an early estrogen-regulated gene in guinea pig endometrial glandular epithelial cells (GEC) and was therefore previously named *gec1* [1, 2].

The GABARAPL1 protein is composed of 117 amino acids, which are highly conserved between species, and belongs to a small family of proteins, called the GABARAP family, based on sequence identity between the different members. In addition to GABARAPL1, this family also includes GABARAP (GABA_A receptor-associated protein), and GABARAPL2/GATE-16 (GABARAP like-2 protein/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa), which share 87% and 61% identity with GABARAPL1, respectively [3, 4]. GABARAPL1 also presents a rather low homology with the MAP-LC3B (microtubule-associated protein light chain 3B) protein [5].

Very few studies regarding the expression of this protein have been conducted because of its strong identity with GABARAP. Indeed, the existence of an antibody that can discriminate between these two proteins has not yet been proven. The tissue specific expression of the *gabrapl1* mRNA, obtained with the use of a probe designed against a unique portion of the 3' UTR, however, reveals that *gabrapl1* is ubiquitously expressed with the highest expression levels observed in the brain. *Gabrapl1* mRNA is, in fact, the most strongly expressed amongst its closest counterparts in multiple rat brain areas ranging from the olfactory bulb to the brainstem and cerebellum, as well as in the spinal cord. In these structures, *gabrapl1* mRNA seems to be localized in neurons and particularly in motoneurons and neuroendocrine neurons [6, 7].

The emergence of new GABARAPL1 protein partners has allowed us to hypothesize the role of this small protein in major cellular processes. GABARAPL1 has been shown to interact *in vitro* with two essential membrane receptors in the brain: GABA_AR (gamma-aminobutyric acid, type A receptor) and KOR (kappa opioid receptor) [8-10]. GABARAPL1 could thus participate in neuronal signal transmission by aiding in the transport of these membrane receptors to the cell surface. Tubulin and NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor), two other GABARAPL1 binding partners, may contribute to the intracellular trafficking of the two aforementioned receptors [8-11]. Tubulin is a major cell component of the cytoskeleton, known to aid in the guidance of intracellular trafficking, and NSF is already known to play a role in trafficking of neuronal receptors such as AMPA (α -amino-3-hydroxy-

1 5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) type glutamate and β -adrenergic receptors.
2 GABARAPL1, *via* its interaction with tubulin, is also able to promote tubulin assembly and
3 microtubule bundling [8]. The contribution of GABARAPL1 to intracellular protein transport
4 is not restricted to the brain as demonstrated by its interaction with PX-RICS [Phox-RhoGAP
5 (GTPase-activating protein) involved in the β -catenin-N-cadherin and NMDA (N-methyl-D-
6 aspartate) receptor signaling], a protein that mediates the transport of the N-cadherin / β -
7 catenin complex from the ER to the Golgi apparatus in HeLa cells [12].
8
9

10
11
12 Due to the high homology between the different members of the GABARAP family,
13 all GABARAPL1 partners outlined above also interact with one or several of the GABARAP
14 family members. Two proteins, namely alpha-synuclein and ARH (Autosomal Recessive
15 Hypercholesterolemia) have been described to interact only with the GABARAPL1 protein
16 but their association with other GABARAP family members has not yet been addressed [13,
17 14].
18
19

20
21
22 Some studies have reported a low expression of *gabarapl1* mRNA in different types of
23 cancers and we recently demonstrated, from the study of a cohort of 265 breast
24 adenocarcinoma biopsies, that patients with a high expression of *gabarapl1* mRNA present a
25 lower risk of recurrence [15, 16].
26
27

28
29
30 Recently, we also described GABARAPL1 as a new marker of autophagosomes. More
31 precisely, we demonstrated that GABARAPL1 is cleaved in the cells to produce its mature
32 form, is linked onto phospholipids and associates with autophagic vesicles [17, 18].
33 Moreover, it has been suggested that GABARAPL1 plays a role in selective autophagy, a
34 form of autophagy that targets specific proteins or organelles to be degraded in the lysosomes,
35 due to its association with p62/SQSTM1 (Sequestosome 1), NBR1 (Neighbour of Brca1 gene)
36 and Nix1/BNIP3L [BNIP3 like protein (BNIP3: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like
37 protein)], which have all been described as cargo adapters [19-22].
38
39

40
41
42 To search for new functions of the GABARAPL1 protein, we looked for new
43 GABARAPL1 partners in rat brain, a tissue that highly expresses *gabarapl1*, by using a GST
44 pull-down assay coupled to mass spectrometry. We report here an interaction between
45 GABARAPL1 and the molecular chaperone HSP90 α/β in rat brain and in MCF-7 cells. In
46 cells, this interaction is disrupted by 17-AAG (17-N-Allylamino-17-
47 demethoxygeldanamycin), a specific inhibitor of HSP90 α/β ATPase activity, and is restored
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

when cells are treated by the potent proteasome inhibitor MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al).
GABARAPL1 can consequently now be defined as a new HSP90 α/β client protein.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and tissue preparation

All animal use and care protocols were in accordance with institutional guidelines (all protocols were approved and investigators authorized). Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate 7% (1 mL/200 g), and then perfused as previously described [23] with 0.9% (w/v) NaCl followed by ice-cold 1% (w/v) paraformaldehyde fixative in 0.1 M phosphate buffer. The brains were removed, post-fixed in the same fixative overnight at 4°C, immersed overnight in a 15% (w/v) sucrose solution at 4°C, and then frozen over liquid nitrogen. Brains were serially cut into 10 µm coronal sections on a cryostat-microtome, mounted on gelatinated slides and stored at -40°C until further analysis.

2.2. Reagents and Antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The following antibodies were used: two different polyclonal anti-GABARAPL1 antibodies, one from Chemicon Millipore (AB15278) for Western blotting experiments and one from Protein Tech Group (11010-1-AP) for immunohistochemistry and immunoprecipitation experiments, polyclonal anti-GFP (Chemicon Millipore, AB3080), monoclonal anti-HSP90α/β (TebuBio, AC88), monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, A2220), monoclonal anti-RIP1 (receptor interacting protein 1) (BD Pharmingen, 551041), monoclonal anti-tubulin (Abcam, ab56676) and polyclonal anti-actin (Sigma, A5060). MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) (Sigma-Aldrich, C2211), bortezomib (Santa Cruz Biotechnology sc-217785), lactacystin (Santa Cruz Biotechnology, sc-3575) and 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) (Sigma-Aldrich, A8476) were prepared in DMSO. The human recombinant HSP90β protein was purchased from Cayman Chemical (10342).

2.3. Plasmids

The pGEX-4T-2, pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 and pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 (22-117) vectors expressing the glutathione S-transferase (GST) enzyme, the GST-GABARAPL1 and the GST-GABARAPL1 (22-117) proteins were described previously [8]. The *gabrarpl1* coding sequence flanked by two tag sequences, coding for a Flag peptide

1 and a six-histidine tail, respectively, was cloned into the *Xba*I and *Bam*H1:*Bgl*III sites of the
2 pSBet vector, [24] allowing expression of the FLAG-GABARAPL1-6HIS protein in
3 *Escherichia coli* bacteria. The pGST-HSP90 α and the pGFP-HSP90 β vectors were kindly
4 provided by Dr. Altieri (University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA) and
5 Dr. J. Kim (Korea University, Seoul, South Korea), respectively.
6
7
8
9

10 **2.4. Cell culture and transfection**

11 The HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) (ATCC, CRL-1573) and MCF-7
12 (Michigan Cancer Foundation) (ATCC, HTB-22) cells were cultured in DMEM (Dulbecco's
13 Minimum Essential Medium, Invitrogen, 11880) supplemented with 2 mM L-Glutamine
14 (Invitrogen, 25030-032), 100 μ g/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, 15140)
15 and 10% (for the HEK293 cells) or 5% (for the MCF-7 cells) foetal bovine serum (FBS,
16 Invitrogen, 10270-106) and kept in a 5% CO₂ incubator at 37°C. The MCF-7-FLAG-
17 GABARAPL1-6HIS and MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cell lines were previously created
18 [17]. These cell lines were maintained in complete medium supplemented with 100 μ g/ml
19 Hygromycin B (PAA, P02-015) and 100 μ g/ml G418 (PAA, P02-012), respectively.
20 TransFast reagent (Promega, E2431) was used to transiently transfect HEK293 cells plated in
21 10 cm-diameter culture dishes (5 x 10⁶ cells per Petri-dish) and Jet Prime reagent (Polyplus
22 Transfection, 114-07) was used to transiently transfect MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells
23 plated in 24-well plates (5 x 10⁴ cells per well), according to the manufacturer's
24 recommendations. Ten μ g or 500 ng of pGFP-HSP90 β vector were used to transfect HEK293
25 and MCF-7 Dsred-GABARARAPL1 cells, respectively.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells plated in 6-well plates (4 x 10⁵ cells per
41 well) or MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells plated in 24-well plates cultured on glass
42 coverslips (5 x 10⁴ cells per well) were treated overnight with 1 μ M of 17-AAG in complete
43 medium for the inhibition of HSP90 α / β activity in the presence or in the absence of 2 μ M
44 MG132, 5 μ M lactacystin or 25 nM bortezomib for the inhibition of proteasome activity.
45 Total proteins extracts from 6-well plates were used for immunoblotting. Cells cultured in 24-
46 well plates were analysed by confocal microscopy.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.5. Expression, production and purification of fusion proteins

The pGST-HSP90 α vector, the pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 and the pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 (22-117) vectors were used to transform BL21-DE3 *E.coli*. The different fusion proteins expressed from these vectors were induced with 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 h. The bacterial pellet, obtained by centrifugation (5000 g, 10 min, 4°C), was resuspended in 800 μ l of PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) supplemented with 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM protease inhibitors (Sigma-Aldrich P8340) and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After sonication (Sonics and Materials) (3 times for 15 s), a second centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) was performed to clear the lysate. The GST-fusion proteins contained in the supernatant were bound to 100 μ l of glutathione-agarose beads (Sigma-Aldrich, G4510). for 2 h at 4°C under agitation. The beads were then washed 3 times in PBS supplemented with 500 mM NaCl.

The FLAG-GABARAPL1-6HIS protein was purified using a Ni-NTA Purification System (Qiagen 30210) according to the manufacturer's instructions. After induction of the pool of the proteins with IPTG, bacterial cells were incubated in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, 500 mM KCl, 10 mM imidazole, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mg/ml lysozyme) for 30 min on ice. After sonication (3 times for 15 s) and centrifugation (16000 g, 30 min, 4°C), the cleared lysate was incubated with Ni-NTA resin for 2 h at 4°C. After centrifugation (5000 g, 5 min, 4°C), the resin was washed 3 times in a wash buffer [(20 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, 100 mM KCl, 20 mM imidazole, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. The FLAG-GABARAPL1-6HIS protein was then eluted with increasing concentrations of imidazole (50 to 250 mM).

2.6. GST pull-down affinity

Total protein lysates from HEK293 cells transiently transfected by the pGFP-HSP90 β vector or from rat brains (previously cut into small pieces and homogenized with a hand-driven Potter-Elvehjem apparatus) were obtained by incubation on ice for 30 min in GST pull-down lysis buffer [(10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0.5% (v/v) NP-40, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM protease inhibitors (Sigma-Aldrich P8340)] followed by centrifugation (30 min, 16000 g, 4°C). Five mg of rat brain protein

1 extract were incubated with GST or GST-GABARAPL1 (prepared as previously described)
2 bound to 100 μ l of glutathione-agarose beads in GST pull-down lysis buffer overnight at 4°C
3 under constant agitation. After three extensive washes in PBS supplemented with 200 mM
4 NaCl, proteins were eluted in 40 μ l of SDS-PAGE loading buffer (78 mM Tris-HCl, pH 6.8,
5 2.5% (w/v) SDS, 12.5% (v/v) glycerol, 6.25% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v)
6 bromophenol blue) and separated on a 10% or a 12.5% SDS-PAGE gel. After Coomassie blue
7 staining, seven protein bands of interest were excised from the gel and analysed by mass
8 spectrometry. To test *in vitro* binding of GABARAPL1 with HSP90 α / β , GST pull-down
9 experiments were performed using GST-HSP90 α , GST-GABARAPL1 or GST-
10 GABARAPL1 (22-117) fusion proteins (prepared as previously described) immobilized on
11 100 μ l glutathione-agarose beads in combination with either a rat brain protein extract (5 mg)
12 or a HEK293 expressing GFP-HSP90 β cell lysate (1 mg) or a purified FLAG-GABARAPL1-
13 6HIS protein (500 ng), or a human recombinant HSP90 β protein (5 μ g).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **2.7. Mass spectrometry analysis**

26 Bands of interest were excised manually from the SDS-PAGE gel and cut into 1 mm³
27 pieces. The gel fragments were then washed in 0.1 M ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) for
28 10 min and dehydrated in acetonitrile for 10 min. Dried pieces of bands were incubated in the
29 dark successively in 10 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)/0.1 M (NH₄HCO₃) (30
30 min at 37 °C), acetonitrile (8 min), 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH₄HCO₃ (20 min), 0.1 M
31 NH₄HCO₃ (2 min) and acetonitrile (8 min). Each piece of band was then digested by 20 μ l of
32 a digestion solution (10 ng/ μ l of trypsin in 40 mM NH₄HCO₃ and 10% (v/v) acetonitrile
33 (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, PROMEGA, V5280)) for 30 min at 4°C. Fifteen μ l
34 of this solution was subsequently removed and 10 μ l of 40 mM NH₄HCO₃/10% (v/v)
35 acetonitrile was added, prior to incubation at 37 °C for 2 h. Resulting peptides were
36 concentrated on C18 (PerfectPure Eppendorf C18, 0030 008 405) according to the
37 manufacturer's instructions. An aliquot (0.5 μ l) of the concentrate solution was then deposited
38 onto a Ground Steel MALDI target together with 1 μ l of matrix solution (3.5 mg/ml α -cyano-
39 4-hydroxycinnamic acid in 50% (v/v) acetonitrile, 0.5% (w/v) trifluoroacetic acid). Peptides
40 were analysed by MS and MS/MS with a MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics,
41 Bremen, Germany) mass spectrometer. Proteins were identified by comparison to the rat
42 MSDB (Mass Spectrometry protein sequence DataBase) databank.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.8. Immunoprecipitation

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Total protein lysates from MCF-7 cells or rat brains (previously cut into small pieces and homogenized with a hand-driven Potter-Elvehjem apparatus) were obtained by incubation on ice for 30 min in immunoprecipitation buffer [50 mM HEPES, pH 7.6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.1% (v/v) NP-40, 1 mM protease inhibitors (Sigma-Aldrich P8340)] followed by a centrifugation (30 min, 16000 g, 4°C). The supernatants were then incubated with 30 µl of magnetic beads (Dynabeads Protein G Invitrogen, 100-03D) together with 2 µg of the indicated antibody [anti-FLAG M2 (Sigma Aldrich) or anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group)] under constant agitation at room temperature for 10 min. MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cell lysate (100 µg) or rat brain extract (500 µg) were then added to the beads and incubated for 30 min at room temperature while agitating. After three washes in PBS, immunocomplexes were eluted in 2X SDS loading buffer and loaded on a 12.5% SDS-PAGE gel. The target proteins were then detected by immunoblotting as described below.

2.9. Western blot analysis

Whole cell lysates (40 µg) were separated by SDS-PAGE on a 10%, 12.5% or a 15% gel before transfer to an Immobilon-P PVDF membrane (Dutscher, 44088). The membranes were blocked with 5% (w/v) skim milk in 0.1% Tween 20/TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20) and incubated at 4°C overnight with primary antibodies in antibody block buffer (0.5% (w/v) skim milk in 0.1% (v/v) Tween 20/TBS). The following antibodies were used at the indicated dilution: polyclonal anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore) (1:2000), polyclonal anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group) (1:1000), polyclonal anti-HSP90β (1:3000), monoclonal anti-HSP90α/β (1:2000), polyclonal anti-GFP (1:5000), monoclonal anti-RIP1 (1:2500), monoclonal anti-tubulin (1:10000) and polyclonal anti-actin (1:10000). Immunoreactive bands were detected using goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-mouse (P.A.R.I.S, BI 2413C) or anti-rabbit (P.A.R.I.S, BI 2407C) antibodies (1:20000 in antibody block buffer) and ECL Plus reagent (GE Healthcare Life Sciences, RPN2132), according to the manufacturer's protocol.

2.10. Immunohistochemistry

Rat brain sections were rinsed in PBS supplemented with 0.3% (v/v) Triton X100 and incubated overnight with the primary anti-GABARAPL1 antibody (1:200) diluted in PBS

1 containing 0.3% (v/v) Triton X100, 1% (w/v) bovine serum albumine, 10% (w/v) skim milk
2 and 0.01% (w/v) sodium azide at room temperature. The labeling was then revealed with a
3 secondary goat anti-rabbit IgG conjugated Alexa Fluor-488 (1:800, Invitrogen) for 1 h at
4 room temperature. Then, sections were incubated, under the same conditions, with the
5 monoclonal anti-HSP90 α/β (1:400) antibody diluted in PBS containing 0.3% (v/v) Triton
6 X100 and revealed with a donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor-555 (1:800,
7 Invitrogen). Fluorescent sections were then observed using a confocal microscope described
8 below.
9
10
11
12
13
14
15

16 **2.11. Confocal microscopy analysis**

17 Cells grown on coverslips were fixed in PBS-paraformaldehyde 4% (w/v) (PFA,
18 Sigma-Aldrich, P6148) for 15 min and washed once with PBS. Cells and labeled brain
19 sections were then analysed using a fluorescence laser scanning confocal microscope
20 Fluoview FV1000 BX (Olympus, France). Images were obtained through a DP 75 numeric
21 camera using the Fluoview FV1000 software (Olympus, France).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3. RESULTS

3.1. Identification of new GABARAPL1-interacting partners.

In order to further understand the biological functions of GABARAPL1, we searched for new interacting partners of this protein using rat brain protein extracts in a GST pull-down experiment coupled to mass spectrometry. Proteins eluted from the GST pull-down experiments were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining. Many proteins displayed a specific interaction with GST-GABARAPL1 (Fig. 1D). Seven intensive bands not present or of lower intensity in the control tracks [corresponding to GST alone (Fig. 1A), GST incubated with rat brain extract (Fig. 1B) and GST-GABARAPL1 alone (Fig. 1C)] were excised from the gel and analysed by mass spectrometry. Of the various potential GABARAPL1 protein partners identified, eleven were confirmed by both MS and MS/MS analysis (Table 1). Among all identified proteins, we recovered tubulin, a protein already known to interact *in vitro* with GABARAPL1 [8] and clathrin heavy chain, a protein described to associate with GABARAP [25]. The HSP90 β protein corresponding to the 84 kDa heat shock protein (Q1PSW2) identified in band n°4 (Fig. 1D) by both MS (Mascot score: 63) and MS/MS (two peptides with respectively a Mascot score of 63 and 61) was particularly interesting due to its implication in numerous cellular processes such as protein folding, stress response, signal transduction and tumor progression [26, 27]. In the rat central nervous system (CNS), HSP90 α/β is markedly expressed throughout all neuronal subpopulations suggesting its functional role in the CNS [28]. Moreover, a recent global analysis of the human autophagic gene network has identified new GABARAPL1 protein partners including the HSP90 α protein in HEK293 cells using immunoprecipitation coupled to mass spectrometry [29].

3.2. GABARAPL1 interacts with HSP90 α/β .

3.2.1. GST pull-down experiments.

A variety of GST pull-down experiments using GST and different GST-fusion proteins [GST-HSP90 α , GST-GABARAPL1, GST-GABARAPL1 (22-117)] were used to confirm the interaction between GABARAPL1 and HSP90 α/β . A GST pull-down assay using recombinant bacterial GST-GABARAPL1 and rat brain protein extracts coupled to Western blot analysis confirmed the *in vitro* interaction of this protein with HSP90 α/β (Fig. 2A). A GST pull-down assay followed by Western blot analysis using an anti-GFP antibody also

1 demonstrated an interaction between these two proteins in HEK293 cells transiently
2 expressing GFP-HSP90 β (Fig. 2B).

3
4 Two different GST pull-down experiments utilizing either GST-GABARAPL1 and the
5 human recombinant HSP90 β protein or GST-HSP90 α and the purified FLAG-GABARAPL1-
6 6HIS protein demonstrated the direct interaction between GABARAPL1 and HSP90 α or
7 HSP90 β (Fig. 2C, D). Moreover, a direct interaction between GST-GABARAP and human
8 recombinant HSP90 β protein was also established (data not shown).
9

10
11
12 Mansuy and colleagues have demonstrated, using a deletion mutant of GABARAPL1
13 in a GST pull-down experiment, that the 22 amino-terminal residues of GABARAPL1 are
14 necessary for tubulin binding [8]. In order to determine if this region of GABARAPL1 is also
15 responsible for its interaction with HSP90 β , we subsequently tested the ability of this deletion
16 mutant to interact with HSP90 β in a pull-down assay performed with HEK293 GFP-HSP90 β
17 cell lysates and with the human recombinant HSP90 β protein. The intensity of the signals
18 corresponding to GFP-HSP90 β and HSP90 β was strongly reduced when using the deletion
19 mutant compared to the wild-type protein, showing that the amino-terminus of GABARAPL1
20 largely contributes to the interaction with HSP90 β (Fig. 2B, C).
21
22
23
24
25
26
27
28

29 All these results show that GABARAPL1 interacts with both HSP90 α and β isoforms.
30

31 32 33 3.2.2. Coimmunoprecipitation experiments.

34 To confirm this interaction *in vivo*, we performed an immunoprecipitation experiment
35 using rat brain extracts and an anti-GABARAPL1 antibody (Protein Tech Group) or an anti-
36 FLAG M2 antibody (Sigma-Aldrich) followed by Western blotting using anti-GABARAPL1
37 (Chemicon, Millipore) and anti-HSP90 α/β antibodies (Fig. 3). The anti-GABARAPL1
38 antibody from Chemicon cross-reacts with GABARAP and GABARAPL1 while the antibody
39 from Protein Tech Group shows little to no cross-reaction with the GABARAP protein under
40 the conditions used (data not shown). In Fig. 3, we note that the HSP90 α/β protein was
41 coimmunoprecipitated with GABARAPL1, confirming an interaction between HSP90 α/β and
42 GABARAPL1 in rat brain (Fig. 3A) and in MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells (Fig.
43 3B). Three different irrelevant antibodies (anti-rabbit GFP, anti-rabbit IgG and anti-mouse
44 IgG) were used as immunoprecipitation negative controls. The use of an anti-GABARAPL1
45 antibody (Chemicon, Millipore) that detects both GABARAPL1 and GABARAP for Western
46 blot analysis showed two bands of different intensity in the brain, a higher and more intense
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 band corresponding to GABARAPL1 and the other one corresponding to GABARAP (Fig.
2 3A). This observation also suggests that GABARAP could interact with HSP90 α/β or that
3 GABARAP was coimmunoprecipitated with GABARAPL1. In MCF-7-FLAG-
4 GABARAPL1-6HIS cells, however, the GABARAPL1/HSP90 α/β interaction is indubitable
5 given that GABARAP could not be immunoprecipitated by the anti-FLAG antibody (Fig.
6 3B).
7
8
9

10 11 12 **3.3. GABARAPL1 colocalizes with HSP90 α/β .**

13 *3.3.1. Colocalization in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells.*

14
15
16 Following demonstration of an *in vitro* and an *in vivo* interaction between
17 GABARAPL1 and HSP90 α/β , we investigated the possibility of a colocalization of these two
18 proteins in the MCF-7-Dsred-GABARAPL1 stable cell line transiently transfected with a
19 plasmid encoding the GFP-HSP90 β protein. This stable cell line overexpresses the red
20 fluorescent Dsred-GABARAPL1 fusion protein, which localizes to perinuclear
21 intracytoplasmic vesicles described to be autophagosomes and lysosomes [17]. Following
22 transfection, the GFP-HSP90 β protein was widely expressed throughout the cell, mainly in
23 the cytoplasm, but also displayed punctate staining. Amongst these dots, a partial
24 colocalization of GABARAPL1 with GFP-HSP90 β was clearly observed (Fig. 4A).
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 *3.3.2. Colocalization in rat brain.*

35
36 To study if this colocalization also occurs *in vivo*, we performed
37 immunohistochemistry on rat brain sections within the dorsal retrosplenial cortex and
38 *substantia nigra* using anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group) and anti-HSP90 α/β
39 antibodies. The anti-GABARAPL1 antibody has been previously used in
40 immunofluorescence staining to detect GABARAPL1 in HT29 cells [30]. These brain areas
41 were previously described to display a strong expression of *gabaprl1* mRNA [6, 7].
42 GABARAPL1 and HSP90 α/β were highly expressed as intracytoplasmic dots and, in
43 agreement with the results obtained in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells, a partial
44 colocalization was observed. Furthermore, both these proteins also presented a diffuse
45 expression throughout the cytoplasm, where they partially colocalized (Fig. 4B).
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.4. 17-AAG promotes proteasome-dependent degradation of GABARAPL1.

HSP90 α/β is a chaperone for several client proteins involved in transcriptional regulation, signal transduction and cell cycle control [26, 27]. The HSP90 α/β activity inhibitor 17-AAG, an analogue of geldanamycin, blocks the association of HSP90 α/β with its substrates by disrupting its ATPase function leading to the degradation of these client proteins. The majority of proteins whose stability is regulated by HSP90 α/β are degraded by the proteasome [31, 32].

Wild-type MCF-7 cells and MCF-7 cells stably expressing the FLAG-GABARAPL1-6HIS fusion protein were treated with 1 μ M of 17-AAG with or without the specific proteasome inhibitor MG132 for 15 h. The efficacy of treatment was first verified by immunodetection of the protein RIP1 in MCF-7 cells (Fig. 5A). The protein RIP1 is a well known HSP90 α/β client protein as proved by disruption of the interaction between these two proteins following geldanamycin treatment. Moreover, geldanamycin-induced degradation of RIP1 was abrogated by MG132 treatment [33].

Similar results were obtained with the GABARAPL1 protein (Fig. 5B). Two signals were apparent in MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells in immunoblotting experiments using the anti-GABARAPL1 antibody from Chemicon. The higher molecular weight band corresponded to FLAG-GABARAPL1-6HIS and the lowest one corresponded to GABARAP. Only one signal corresponding to FLAG-GABARAPL1-6HIS was detectable with the anti-FLAG M2 antibody (Sigma-Aldrich) (data not shown). The endogenous GABARAPL1 protein is not usually apparent in immunoblot experiments performed on untreated MCF-7 and MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells. 17-AAG treatment caused a marked decrease in the level of FLAG-GABARAPL1-6HIS protein compared with non-treated cells. This result indicates that GABARAPL1 may be a client protein for active HSP90 α/β since the molecular chaperoning activity of HSP90 α/β appears to play an important role in the stability of GABARAPL1 in cells. We therefore hypothesized, that following treatment with 17-AAG, the interaction between the two proteins is abolished leading to FLAG-GABARAPL1-6HIS degradation by the proteasome. To confirm our hypothesis, we treated MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells with the MG132 proteasome inhibitor. This treatment considerably enhanced the level of FLAG-GABARAPL1-6HIS in the cells. Interestingly, double treatment with 17-AAG and MG132 led to the same result, implying that proteasomal inhibition prevents the degradation of GABARAPL1 induced by 17-AAG. As an aside, an additional

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

signal, located between the bands corresponding to FLAG-GABARAPL1-6HIS and endogenous GABARAP, was observed in this experiment. We propose that this signal corresponds to the endogenous GABARAPL1 protein. The treatment of non-transfected MCF-7 cells with MG132 revealed this same new signal, strongly suggesting the enhancement of endogenous GABARAPL1 protein levels, as well.

As shown in Fig. 6A and B, the MG132 effect is maximal at a concentration of 2 μ M and after 15 h of treatment. We then used two different proteasome inhibitors (lactacystin and bortezomib) to confirm that this effect is not due to side effects of MG132. As already observed in the MG132 experiments, treatment with either of these two chemicals resulted in an increased expression of FLAG-GABARAPL1-6HIS and the apparition of a signal corresponding to endogenous GABARAPL1 (from 2.5 μ M of lactacystin and from 10 nM of bortezomib) (Fig. 6C, D). We can thus confirm the expression of endogenous GABARAPL1 following proteasomal degradation blockade.

Interestingly, unlike GABARAPL1, no variation of GABARAP expression was observed with any of the proteasomal inhibitors tested, suggesting that these two highly related proteins are subjected to different post-translational regulation in cells under the conditions tested (Fig. 5, 6).

Consequently, we can conclude that disruption of the chaperoning activity of HSP90 α/β by 17-AAG causes the degradation of exogenous FLAG-GABARAPL1-6HIS and endogenous GABARAPL1 through the proteasome since the use of proteasome specific inhibitors leads to an accumulation of both the FLAG-GABARAPL1-6HIS and GABARAPL1 proteins in the cells.

Finally, we assessed effects of this disruption on the cellular localization and/or expression of Dsred-GABARAPL1 in MCF-7 cells by confocal microscopy (Fig. 7). Similar to the results obtained by Western blot, 17-AAG treatment led to the reduction of Dsred-GABARAPL1 staining, whereas an opposite effect was observed when cells were stimulated with MG132 and 17-AAG combined with MG132.

4. DISCUSSION

In this study, a GST pull-down assay followed by mass spectrometry analysis led to the discovery of various new GABARAPL1 partners, opening the door to new functional investigations for this protein. Among these partners, we identified HSP90 β as a new GABARAPL1-interacting protein. We also confirmed previously published GABARAPL1 and/or GABARAP protein-interactions. For example, we found the clathrin heavy chain protein, a GABARAP cellular partner that is essential in the formation of coated vesicles [25]. In the brain, neurons regulate the number of postsynaptic receptors, such as GABA_A receptors, by internalization in clathrin-coated vesicles. Amongst identified proteins in mass spectrometry analysis, we also found the AP-2 (adaptor protein 2) and dynamin (D100) proteins which are known to take part in GABA_A receptors endocytosis [34, 35]. Consequently, GABARAPL1 may associate with these three proteins to aid in the turnover of GABA_A receptors. Subunits of tubulin were also identified, reinforcing the hypothesis that GABARAPL1 mediates intracellular trafficking of proteins, such as GABA_A or k-opioid receptors, in the brain [8, 9, 11].

We then focused our attention on the potential new GABARAPL1 interacting partner HSP90 β because of its involvement in various cellular processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis [36]. HSP90 α/β is a highly conserved and abundant protein in eukaryotic cells, corresponding to 1-2% of total cellular proteins under non-stress conditions [37]. There are two major cytoplasmic isoforms of HSP90, HSP90 α and HSP90 β , which share approximately 86% identity in vertebrate species [38]. HSP90 α/β is a molecular chaperone that interacts with multiple co-chaperones to assure the maintenance of protein quality in the cell by regulating the balance between folding and degradation of proteins. There is a growing list of HSP90 α/β client proteins, which now includes several hundreds of proteins [27]. HSP90 α/β client proteins include a variety of transcription factors such as mutated p53, protein kinases (Akt, ErbB2, Raf, RIP1), cell surface receptors and cellular enzymes. The NH₂-terminal ATP/ADP binding pocket of HSP90 α/β is important for its folding function as a chaperone. Moreover, this domain is the binding site of specific drugs including ansamycin antibiotics such as geldanamycin and its modified derivative 17-AAG [39]. These drugs competitively inhibit ATP binding and induce a conformational change in the HSP90 α/β molecule that results in a destabilization of its interaction with its chaperoned proteins and their subsequent degradation through the proteasome pathway [40]. These drugs also display

1 antitumor activity in numerous animal tumor models and their effects are currently being
2 evaluated in several clinical trials [32, 41-43].

3
4 In this work, we demonstrate that GABARAPL1 interacts directly with both HSP90 α
5 and β isoforms as demonstrated by use of either purified GST-HSP90 α or HSP90 β proteins in
6 GST pull-down assays and by use of an antibody directed against the two isoforms in
7 coimmunoprecipitation experiments. In the immunoprecipitation experiment performed using
8 rat brain extracts, an antibody directed against GABARAPL1 *versus* GABARAP was used to
9 immunoprecipitate GABARAPL1 and an antibody recognizing the two proteins was used in
10 immunoblot. In the brain, the GABARAP protein, although to a lesser extent than
11 GABARAPL1, was immunoprecipitated disallowing us to exclude the possibility of an
12 interaction between GABARAP and HSP90 α/β or between GABARAPL1 and GABARAP.
13 However, in the MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cellular model, the specific interaction
14 between GABARAPL1 and HSP90 α/β is confirmed with the use of an anti-FLAG antibody,
15 which specifically immunoprecipitates GABARAPL1. Moreover, the interaction between
16 GABARAP and HSP90 α/β was confirmed by *in vitro* pull-down experiments (data not
17 shown) and was also observed by Behrends et al. in HEK293 cells [29]. This same study
18 revealed, on one hand, a potential interaction between HSP90 α and/or β isoforms and all
19 other Atg8 family members, GATE-16, LC3A, LC3B and LC3C and on the other hand, the
20 interaction between GABARAPL1 and other HSP proteins such as HSP70, HSP60 and
21 HSP105.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Mansuy et al. previously demonstrated that the first 22 amino-terminal residues of
37 GABARAPL1 are implicated in tubulin binding [8]. Here, we show that the presence of this
38 basic N-terminal region (pHi 9.6) allows for a stronger interaction between GABARAPL1
39 and the acidic HSP90 α/β protein (pHi 5). Distribution of both GABARAPL1 and HSP90 α/β
40 proteins was analysed in MCF-7 stably expressing Dsred-GABARAPL1 and in two rat brain
41 regions known to express high levels of *gabarapl1* mRNA (cortex and *substantia nigra*).
42 Experiments performed in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells revealed a partial colocalization
43 of Dsred-GABARAPL1 and GFP-HSP90 β in intracytoplasmic perinuclear dots. A similar
44 partial colocalization was found in the two rat brain regions studied by
45 immunohistochemistry.
46
47
48
49
50
51
52
53

54 The role of the association between GABARAPL1 and HSP90 α/β was established by
55 the use of the HSP90 α/β activity specific inhibitor 17-AAG. Following disruption of the
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 interaction between the two proteins, the degradation of GABARAPL1 was demonstrated to
2 be mediated by the proteasome as established by the use of various potent proteasome
3 inhibitors. Interestingly, unlike GABARAPL1, GABARAP protein levels were not affected
4 by the different treatments despite the fact that GABARAP might interact with HSP90 α/β ,
5 highlighting a major difference in the regulation of these two closely related homologues. We
6 have demonstrated, using quantitative RT-PCR experiments an increase of the endogenous
7 *gabarapl1* mRNA level in MCF-7 cells treated by MG132 (data not shown). Moreover, gene
8 profiling studies of prostate cancer cells treated with MG132 and pancreatic cancer cells
9 treated with bortezomib revealed an up-regulation of *gabarapl1* and *lc3* mRNA [44, 45].
10 However, in our MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS model, the rate of synthesis of the
11 fusion protein increases independently of the transcriptional activation. On the other hand, the
12 increase of the endogenous GABARAPL1 protein level is due to a regulation of its stability
13 associated with a transcriptional regulation of the *gabarapl1* gene. Recent studies have
14 demonstrated that inhibition of proteasomal degradation by specific inhibitors induces
15 autophagy, identified by accumulation of LC3B-II, the lipidated form of LC3B that localizes
16 to autophagosomes [46-48]. It is now obvious that these two major routes of degradation are
17 intimately linked. In particular, impairment of degradation by the proteasome pathway causes
18 induction of autophagy [49]. Surprisingly, no presence of the GABARAPL1-II form, already
19 observed in cells by Chakrama et al. in autophagic conditions [17], is detectable in our
20 experiments, suggesting that GABARAPL1 is not associated to autophagic vesicles following
21 the inhibition of proteasomal activity. These observations therefore describe a differential
22 regulation of GABARAPL1 and LC3B in presence of proteasome inhibitors.

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40 Generally, prior ubiquitinylation of the majority of HSP90 α/β client proteins is
41 required for them to be recognized and subsequently delivered to the proteasome. Some
42 oncosuppressive client proteins, however, such as p53, display a ubiquitin-independent
43 degradation by the proteasome [50]. Moreover, LC3B can be processed by the 20S core
44 proteasome in a ubiquitin-independent manner *in vitro* and this degradation is inhibited by its
45 interaction with p62, a mediator of autophagic proteolysis [51]. Whether the ubiquitinylation
46 of GABARAPL1 is necessary to induce its degradation by the proteasome will be
47 investigated in the future. Concerning GABARAP, Chen et al. suggest that GABARAP does
48 not undergo the ubiquitinylation process and is not degraded through the proteasome after
49 lactacystin treatment in rat cultured hippocampal neurons [52].
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In this report, we successfully screened for novel GABARAPL1 binding partners by performing a simple pull-down assay coupled to mass spectrometry, demonstrating that GABARAPL1 associates with the HSP90 α/β protein and providing evidence for a direct interaction between these two proteins. This study shows, for the first time, that HSP90 α/β protects GABARAPL1 from its proteasomal degradation and therefore increases its stability in MCF-7 cells. These findings provide new and interesting information about the GABARAPL1 turnover within the cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

1
2 We are grateful to Dr. Altieri and Dr. J. Kim for kindly providing the pGST-HSP90 α
3 and the pGFP-HSP90 β vectors. We would like to thank Fabrice Poncet, Sophie Launay
4 (Plateformes microscopie et séquençage, IFR133, Besançon), Valérie Perez and Elodie Bôle-
5 Richard for their technical help.
6
7

8
9 This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer (Conférence de
10 Coordination InterRégionale-Grand Est), Comité du Doubs. Stéphanie Seguin-Py is supported
11 by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. Sophie Croizier,
12 Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn Nicole Le Grand are supported by fellowships from the
13 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

- 1
2
3 [1] I. Pellerin, C. Vuillermoz, M. Jouvenot, C. Ordener, M. Royez, G.L. Adessi,
4 Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig
5 endometrial cells, *Mol Cell Endocrinol* 90 (1993) R17-21.
6
7
8 [2] N. Le Grand, F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M.
9 Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, GABARAPL1 (GEC1) : original or copycat?, *Autophagy*
10 (2011) in press.
11
12
13 [3] Y. Paz, Z. Elazar, D. Fass, Structure of GATE-16, membrane transport modulator and
14 mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p, *J Biol Chem* 275 (2000) 25445-
15 25450.
16
17
18 [4] Y. Sagiv, A. Legesse-Miller, A. Porat, Z. Elazar, GATE-16, a membrane transport
19 modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28, *Embo J* 19 (2000) 1494-
20 1504.
21
22
23 [5] Y. Xin, L. Yu, Z. Chen, L. Zheng, Q. Fu, J. Jiang, P. Zhang, R. Gong, S. Zhao,
24 Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse
25 homologues of GABA(A) receptor-associated protein, *Genomics* 74 (2001) 408-413.
26
27
28 [6] V. Mansuy-Schlick, F. Tolle, R. Delage-Mourroux, A. Fraichard, P.Y. Risold, M.
29 Jouvenot, Specific distribution of gabarap, gec1/gabarap Like 1, gate16/gabarap Like 2, lc3
30 messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR, *Brain Res* 1073-1074
31 (2006) 83-87.
32
33
34 [7] F. Tolle, P.Y. Risold, V. Mansuy-Schlick, E. Rossi, M. Boyer-Guittaut, A. Fraichard,
35 M. Jouvenot, Specific regional distribution of gec1 mRNAs in adult rat central nervous
36 system, *Brain Res* 1210 (2008) 103-115.
37
38
39 [8] V. Mansuy, W. Boireau, A. Fraichard, J.L. Schlick, M. Jouvenot, R. Delage-
40 Mourroux, GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A)
41 receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 325 (2004) 639-648.
42
43
44 [9] C. Chen, J.G. Li, Y. Chen, P. Huang, Y. Wang, L.Y. Liu-Chen, GEC1 interacts with
45 the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor, *J Biol Chem* 281 (2006)
46 7983-7993.
47
48
49 [10] Y. Chen, C. Chen, E. Kotsikorou, D.L. Lynch, P.H. Reggio, L.Y. Liu-Chen, GEC1-
50 kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like
51 effect, *J Biol Chem* 284 (2009) 1673-1685.
52
53
54 [11] C. Chen, Y. Wang, P. Huang, L.Y. Liu-Chen, Effects of C-terminal modifications of
55 GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor
56 expression, *J Biol Chem* 286 (2011) 15106-15115.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [12] T. Nakamura, T. Hayashi, Y. Nasu-Nishimura, F. Sakaue, Y. Morishita, T. Okabe, S.
2 Ohwada, K. Matsuura, T. Akiyama, PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-
3 cadherin/beta-catenin complex, *Genes Dev* 22 (2008) 1244-1256.
- 4 [13] C. Schnack, K.M. Danzer, B. Hengerer, F. Gillardon, Protein array analysis of
5 oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an
6 interference with Cdc42 effector proteins, *Neuroscience* 154 (2008) 1450-1457.
- 7
8
9 [14] M.G. Mameza, J.M. Lockard, E. Zamora, M. Hillefors, Z.S. Lavina, B.B. Kaplan,
10 Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular
11 interactions, *J Neurochem* 103 (2007) 927-941.
- 12
13 [15] C. Nemos, V. Mansuy, S. Vernier-Magnin, A. Fraichard, M. Jouvenot, R. Delage-
14 Mourroux, Expression of *gec1/GABARAPL1* versus *GABARAP* mRNAs in human:
15 predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system, *Brain Res Mol Brain Res*
16 119 (2003) 216-219.
- 17
18
19 [16] A. Berthier, S. Seguin, A.J. Sasco, J.Y. Bobin, G. De Laroche, J. Datchary, S. Saez, C.
20 Rodriguez-Lafrasse, F. Tolle, A. Fraichard, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, R. Delage-
21 Mourroux, F. Descotes, High expression of *gabarapl1* is associated with a better outcome for
22 patients with lymph node-positive breast cancer, *British journal of cancer* 102 (2010) 1024-
23 1031.
- 24
25 [17] F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, J.N. Le Grand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G.
26 Despouy, V. Perez, M. Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, *GABARAPL1 (GEC1)* associates with
27 autophagic vesicles, *Autophagy* 6 (2010) 1-11.
- 28
29 [18] V.M. Betin, J.D. Lane, Caspase cleavage of *Atg4D* stimulates *GABARAP-L1*
30 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis, *J Cell Sci* 122 (2009) 2554-
31 2566.
- 32
33 [19] S. Pankiv, T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn,
34 G. Bjorkoy, T. Johansen, *p62/SQSTM1* binds directly to *Atg8/LC3* to facilitate degradation of
35 ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *J Biol Chem* 282 (2007) 24131-24145.
- 36
37 [20] K.B. Larsen, T. Lamark, A. Overvatn, I. Harneshaug, T. Johansen, G. Bjorkoy, A
38 reporter cell system to monitor autophagy based on *p62/SQSTM1*, *Autophagy* 6 (2010) 784-
39 793.
- 40
41 [21] J.F. Rual, K. Venkatesan, T. Hao, T. Hirozane-Kishikawa, A. Dricot, N. Li, G.F.
42 Berriz, F.D. Gibbons, M. Dreze, N. Ayivi-Guedehoussou, N. Klitgord, C. Simon, M. Boxem,
43 S. Milstein, J. Rosenberg, D.S. Goldberg, L.V. Zhang, S.L. Wong, G. Franklin, S. Li, J.S.
44 Albala, J. Lim, C. Fraughton, E. Llamas, S. Cevik, C. Bex, P. Lamesch, R.S. Sikorski, J.
45 Vandenhaute, H.Y. Zoghbi, A. Smolyar, S. Bosak, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, M.E.
46 Cusick, D.E. Hill, F.P. Roth, M. Vidal, Towards a proteome-scale map of the human protein-
47 protein interaction network, *Nature* 437 (2005) 1173-1178.
- 48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [22] I. Novak, V. Kirkin, D.G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F.
2 Lohr, D. Popovic, A. Occhipinti, A.S. Reichert, J. Terzic, V. Dotsch, P.A. Ney, I. Dikic, Nix
3 is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance, *EMBO Rep* 11 (2010) 45-51.
4
- 5 [23] F. Brischoux, D. Fellmann, P.Y. Risold, Ontogenetic development of the diencephalic
6 MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis, *Eur J Neurosci* 13 (2001) 1733-1744.
7
- 8 [24] P.M. Schenk, S. Baumann, R. Mattes, H.H. Steinbiss, Improved high-level expression
9 system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare
10 ArgRNAs, *Biotechniques* 19 (1995) 196-198, 200.
11
- 12 [25] J. Mohrluder, Y. Hoffmann, T. Stangler, K. Hanel, D. Willbold, Identification of
13 clathrin heavy chain as a direct interaction partner for the gamma-aminobutyric acid type A
14 receptor associated protein, *Biochemistry* 46 (2007) 14537-14543.
15
- 16 [26] A. Gimenez Ortiz, J. Montalar Salcedo, Heat shock proteins as targets in oncology,
17 *Clin Transl Oncol* 12 (2010) 166-173.
18
- 19 [27] P. Csermely, T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka, G. Nardai, The 90-kDa molecular
20 chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review,
21 *Pharmacol Ther* 79 (1998) 129-168.
22
- 23 [28] P. Gass, H. Schroder, P. Prior, M. Kiessling, Constitutive expression of heat shock
24 protein 90 (HSP90) in neurons of the rat brain, *Neurosci Lett* 182 (1994) 188-192.
25
- 26 [29] C. Behrends, M.E. Sowa, S.P. Gygi, J.W. Harper, Network organization of the human
27 autophagy system, *Nature* 466 (2010) 68-76.
28
- 29 [30] F. Chiacchiera, A. Matrone, E. Ferrari, G. Ingravallo, G. Lo Sasso, S. Murzilli, M.
30 Petruzzelli, L. Salvatore, A. Moschetta, C. Simone, p38alpha blockade inhibits colorectal
31 cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent
32 transcription, *Cell Death Differ* 16 (2009) 1203-1214.
33
- 34 [31] B.S. Blagg, T.D. Kerr, Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90
35 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation, *Med Res Rev* 26 (2006)
36 310-338.
37
- 38 [32] L. Neckers, Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents, *Trends Mol*
39 *Med* 8 (2002) S55-61.
40
- 41 [33] J. Lewis, A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers, Z.G. Liu, Disruption
42 of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting
43 protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB
44 activation, *J Biol Chem* 275 (2000) 10519-10526.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [34] J.T. Kittler, P. Delmas, J.N. Jovanovic, D.A. Brown, T.G. Smart, S.J. Moss, Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons, *J Neurosci* 20 (2000) 7972-7977.
- [35] D. Herring, R. Huang, M. Singh, L.C. Robinson, G.H. Dillon, N.J. Leidenheimer, Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor, *J Biol Chem* 278 (2003) 24046-24052.
- [36] A.S. Sreedhar, E. Kalmar, P. Csermely, Y.F. Shen, Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance, *FEBS Lett* 562 (2004) 11-15.
- [37] D. Picard, Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation, *Cell Mol Life Sci* 59 (2002) 1640-1648.
- [38] R.S. Gupta, Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species, *Mol Biol Evol* 12 (1995) 1063-1073.
- [39] C. Prodromou, S.M. Roe, R. O'Brien, J.E. Ladbury, P.W. Piper, L.H. Pearl, Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone, *Cell* 90 (1997) 65-75.
- [40] S. Sharp, P. Workman, Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status, *Adv Cancer Res* 95 (2006) 323-348.
- [41] M.P. Goetz, D.O. Toft, M.M. Ames, C. Erlichman, The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy, *Ann Oncol* 14 (2003) 1169-1176.
- [42] S.Z. Usmani, R. Bona, Z. Li, 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer--from bench to bedside, *Curr Mol Med* 9 (2009) 654-664.
- [43] U. Banerji, Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot, *Clin Cancer Res* 15 (2009) 9-14.
- [44] W. Yang, J. Monroe, Y. Zhang, D. George, E. Bremer, H. Li, Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells, *Cancer Lett* 243 (2006) 217-227.
- [45] Z.Y. Tang, Y.L. Wu, S.L. Gao, H.W. Shen, Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells, *J Surg Res* 145 (2008) 111-123.
- [46] W.K. Wu, Y.C. Wu, L. Yu, Z.J. Li, J.J. Sung, C.H. Cho, Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 374 (2008) 258-263.

1 [47] W.X. Ding, H.M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D.B. Stolz, D. Ron, X.M. Yin, Linking
2 of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic
3 reticulum stress and cell viability, *Am J Pathol* 171 (2007) 513-524.

4 [48] M. Milani, T. Rzymiski, H.R. Mellor, L. Pike, A. Bottini, D. Generali, A.L. Harris, The
5 role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with
6 Bortezomib, *Cancer Res* 69 (2009) 4415-4423.

7 [49] V.I. Korolchuk, F.M. Menzies, D.C. Rubinsztein, A novel link between autophagy and
8 the ubiquitin-proteasome system, *Autophagy* 5 (2009) 862-863.

9 [50] I. Jariel-Encontre, G. Bossis, M. Piechaczyk, Ubiquitin-independent degradation of
10 proteins by the proteasome, *Biochim Biophys Acta* 1786 (2008) 153-177.

11 [51] Z. Gao, N. Gammoh, P.M. Wong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, X. Jiang,
12 Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome, *Autophagy* 6 (2010) 126-137.

13 [52] Z.W. Chen, C.S. Chang, T.A. Leil, R.W. Olsen, C-terminal modification is required
14 for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking, *J Neurosci* 27 (2007) 6655-6663.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Identification of new GABARAPL1-interacting proteins by GST pull-down assay coupled to mass spectrometry.

GST (**A, B**) and GST-GABARAPL1 (**C, D**) were expressed in *E.coli* and purified by glutathione-agarose affinity chromatography prior to incubation with rat brain protein extracts (**B, D**). After extensive washing, bound material was resolved by SDS-PAGE (10%) and analyzed by Coomassie staining. Several proteins specifically bound GABARAPL1 and seven bands were excised from the gel to undergo tryptic digestion and mass spectrometry analysis (**Table 1**).

Fig. 2. GABARAPL1 interacts with HSP90 α/β *in vitro*.

(**A**) Total proteins from rat brain were incubated with GST-GABARAPL1 or GST. Input represents 0.8% of the amount of rat brain extract used in pull-down. (**B**) HEK293 GFP-HSP90 β cell lysate was incubated with GST, GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL1 (22-117). Input represents 20% of the amount of cell lysate used in pull-down. (**C**) Human recombinant HSP90 β protein was incubated with either GST, GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL1 (22-117). Input represents 10% of the amount of cell lysate used in pull-down. (**D**) Recombinant FLAG-GABARAPL1-6HIS protein was incubated with either GST or GST-HSP90 α . Input represents 10% of the recombinant protein used in pull-down. For each GST pull-down experiment the bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE and analysed by Western blotting using either anti-HSP90 α/β (**A, C**) or anti-GFP (**B**) or anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore) antibodies (**D**). Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

Fig. 3. GABARAPL1 interacts with HSP90 α/β *in vivo*.

Immunodetection of HSP90 α/β and GABARAPL1 (Chemicon antibody) from 500 μ g of rat brain extract (**A**) and 100 μ g of MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cell lysate (**B**) after GABARAPL1 immunoprecipitation [anti-GABARAPL1 antibody (Protein Tech Group) (**A**) or anti-FLAG antibody (**B**)]. Three irrelevant antibodies (IP GFP, IP rabbit IgG or IP mouse IgG) were used. Inputs represent 8% (**A**) and 40% (**B**) of the amount of cell lysate used in immunoprecipitation. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

1
2 **Fig. 4. GABARAPL1 partially colocalizes with HSP90 α / β in MCF-7-Dsred-**
3 **GABARAPL1 cells and in rat brain.**

4
5 (A) MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells were transfected by GFP-HSP90 β -expressing vector.
6
7 36 h after transfection, cells were fixed and analysed by confocal microscopy. (B)
8
9 GABARAPL1 (detected with the Protein Tech Group antibody) and HSP90 α / β proteins from
10
11 dorsal retrosplenial cortex or *substantia nigra* were analysed by confocal microscopy
12
13 following immunohistochemistry experiments. Images were acquired at a 120x magnification.
14
15 Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.
16

17
18 **Fig. 5. GABARAPL1 is a client protein of HSP90 α / β .**

19
20 (A) MCF-7 cells were treated with MG132 (2 μ M) or/and 17-AAG (1 μ M) for 15 h. Western
21
22 blotting experiments were performed for RIP1 and tubulin. (B) MCF-7-FLAG-
23
24 GABARAPL1-6HIS cells or MCF-7 cells were treated with MG132 (2 μ M) or/and 17-AAG
25
26 (1 μ M) for 15 h. Western blotting experiments were performed for GABARAPL1 (with the
27
28 Chemicon antibody) and tubulin. A representative experiment of three performed is shown.
29

30
31 **Fig. 6. GABARAPL1 degradation is inhibited by proteasome inhibitors.**

32
33 (A) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with 2 μ M MG132 for 1–15 h.
34
35 Western blotting was performed for GABARAPL1 (Chemicon antibody) and tubulin. (B)
36
37 MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with different concentrations of
38
39 MG132 (0.2 μ M to 2 μ M) for 15 h. Western blotting was performed to detect GABARAPL1
40
41 (Chemicon antibody) and tubulin. (C) (D) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were
42
43 treated with different concentrations of lactacystin (0.5 μ M to 10 μ M) (C) or bortezomib (5
44
45 nM to 100 nM) (D) for 15 h. Western blottings were performed for GABARAPL1 (Chemicon
46
47 antibody), tubulin and actin. Each figure represents one of three independent experiments
48
49 performed with similar results.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

1
2 **Fig. 7. Dsred-GABARAPL1 expression in MCF-7 cells is modified following 17-AAG**
3 **and MG132 treatments.**

4 Cells (5×10^4), plated on coverslips, were treated with 17-AAG (1 μ M), MG132 (2 μ M) or
5 both agents for 15 h. Cells were then fixed and analysed by confocal microscopy. Images
6 were acquired at a 40x magnification. Each figure represents one of three independent
7 experiments performed with similar results.
8
9

10
11
12 **Table I. Mass spectrometry results for the seven bands identified by MALDI-TOF MS**
13 **and/or MS/MS following GST pull-down experiments performed from total rat brain.**

14 *: the reported theoretical MW is that of the protein in the database MSDB.

15 †: in MS mode, a Mascot score above 56 is significant ($p < 0.05$).

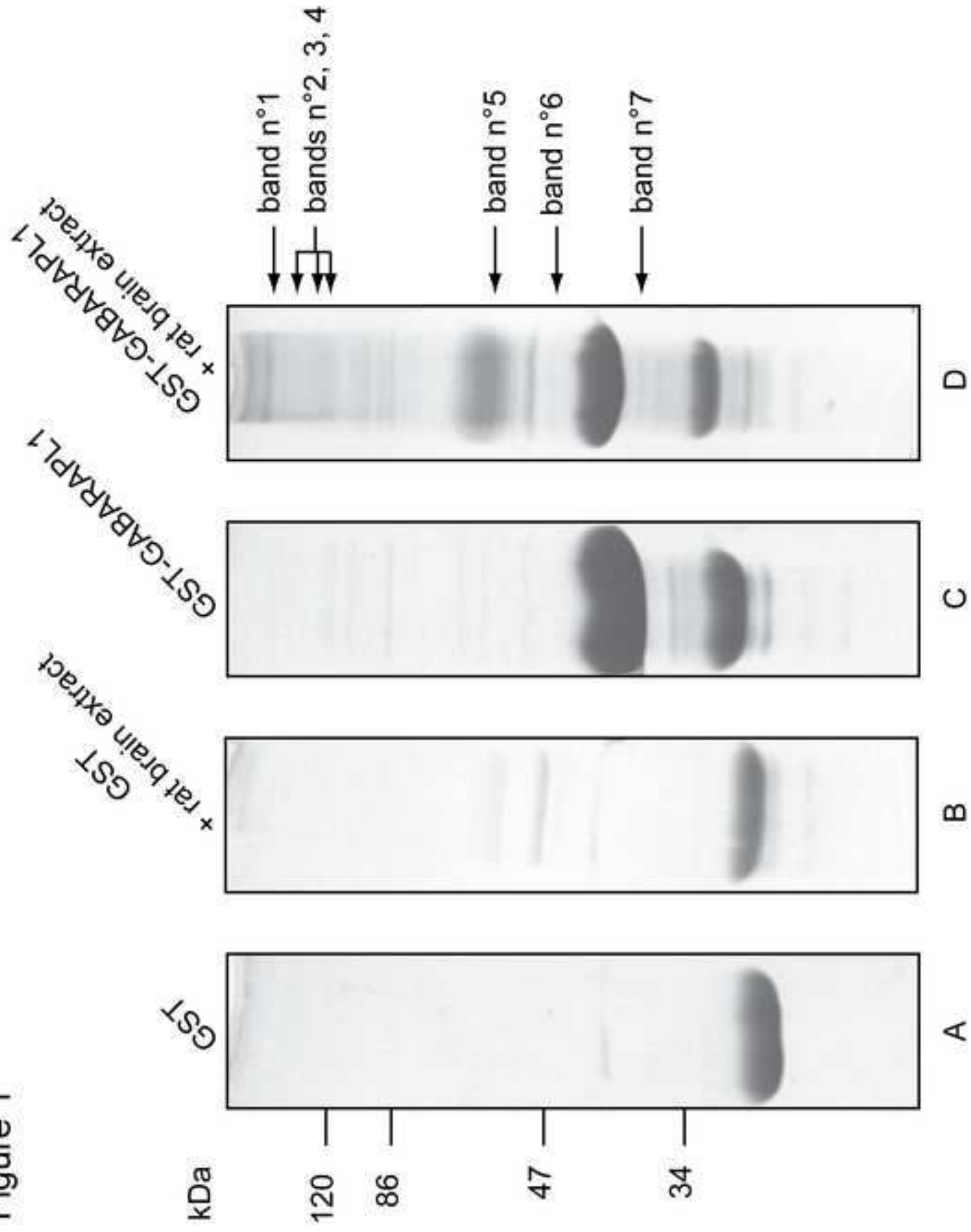
16 ‡: precursor ions are single-charged unless stated.

17 §: in MS/MS mode, a Mascot score above 30 is significant ($p < 0.05$).

Bands	Protein (accession number)	Theoretical vs apparent MW (kDa) *	Matched peptides (MS mode)	Percentage of coverage	Mascot score †	m/z of the precursor ion (MS/MS mode) ‡	Mascot score §
1	Clathrin heavy chain (LRRTH)	193.2/180	63	37.7	447	1296 1942	44 96
2	RIM2-5B (AAF81653)	173.2/140	35	26.5	61		
3	D100 protein (S11508)	96.2/120	25	24.5	96	2093	32
	Na ⁺ /K ⁺ exchanging ATPase alpha-3 chain (C24639)	113/120	14	17.6	61		
	AP-2 complex subunit alpha-2 (AP2A2)	104.8/120	11	14.3	63	1586	31
4	84 KDa heat shock protein (Q1PSW2)	83.6/110	19	30	63	2255 1348	63 61
	Proteasome 26-S subunit non-ATPase 2 (Q4FZT9)	100.9/110	19	30.2	63		
5	Tubulin beta-2 (Q6P9T8)	50.2/55	37	68.8	228	1229 1620 2014	70 48 69
	Tubulin alpha chain (UBRTA)	50.8/55	25	59.6	133	1756 2415	81 94
6	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (AAH85811)	46/45	10	21.6	66	1359	43
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Q9QWU4)	36.1/40	18	42.6	113	1779	73
	Guanidine nucleotide binding protein beta 2 (P54313)	37.3/40	-	-	-	1336	57
	Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	269.5/40	-	-	-	1927	52

Table I

Figure 1



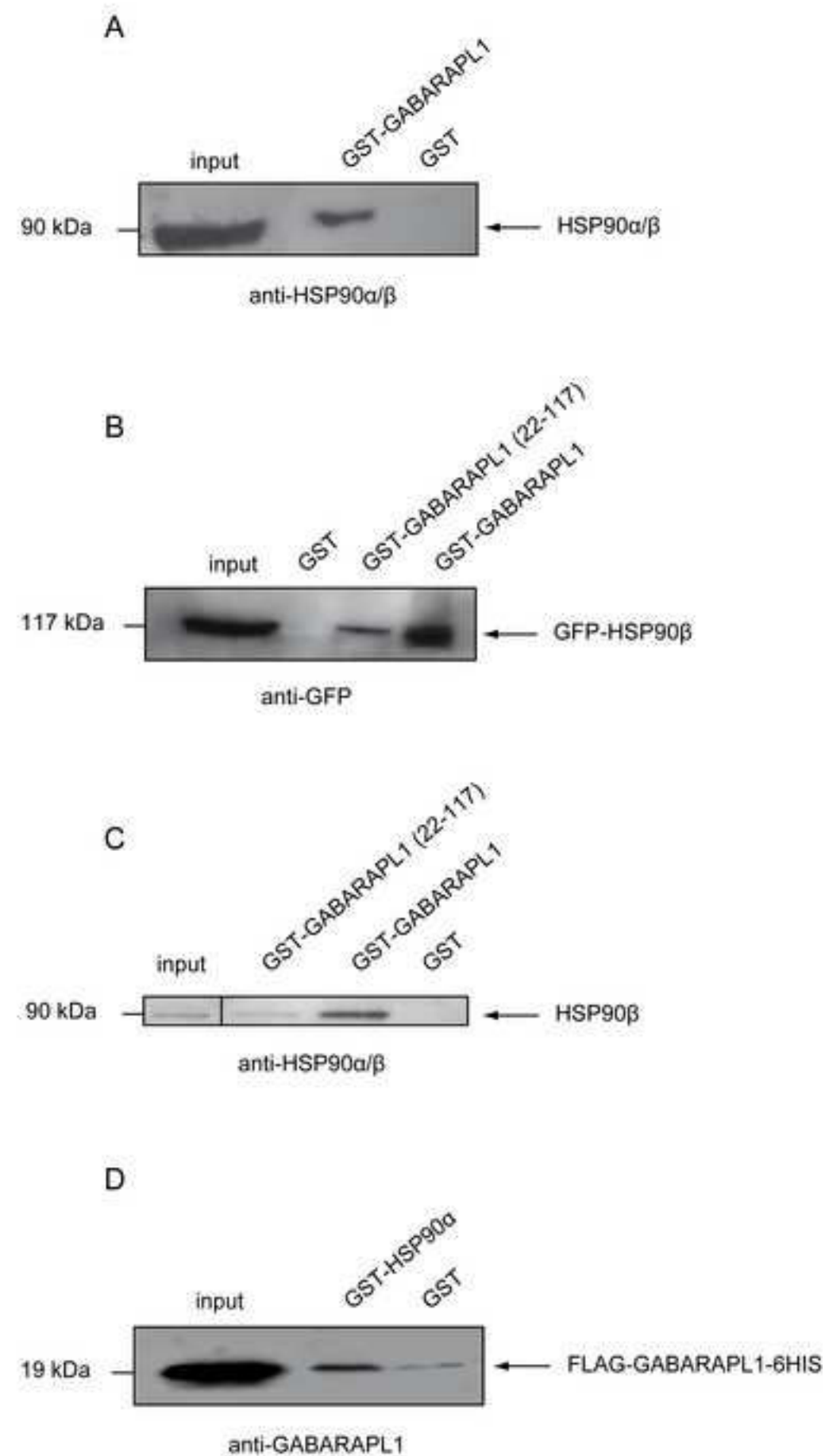
Figure[Click here to download high resolution image](#)**Figure 2**

Figure 3

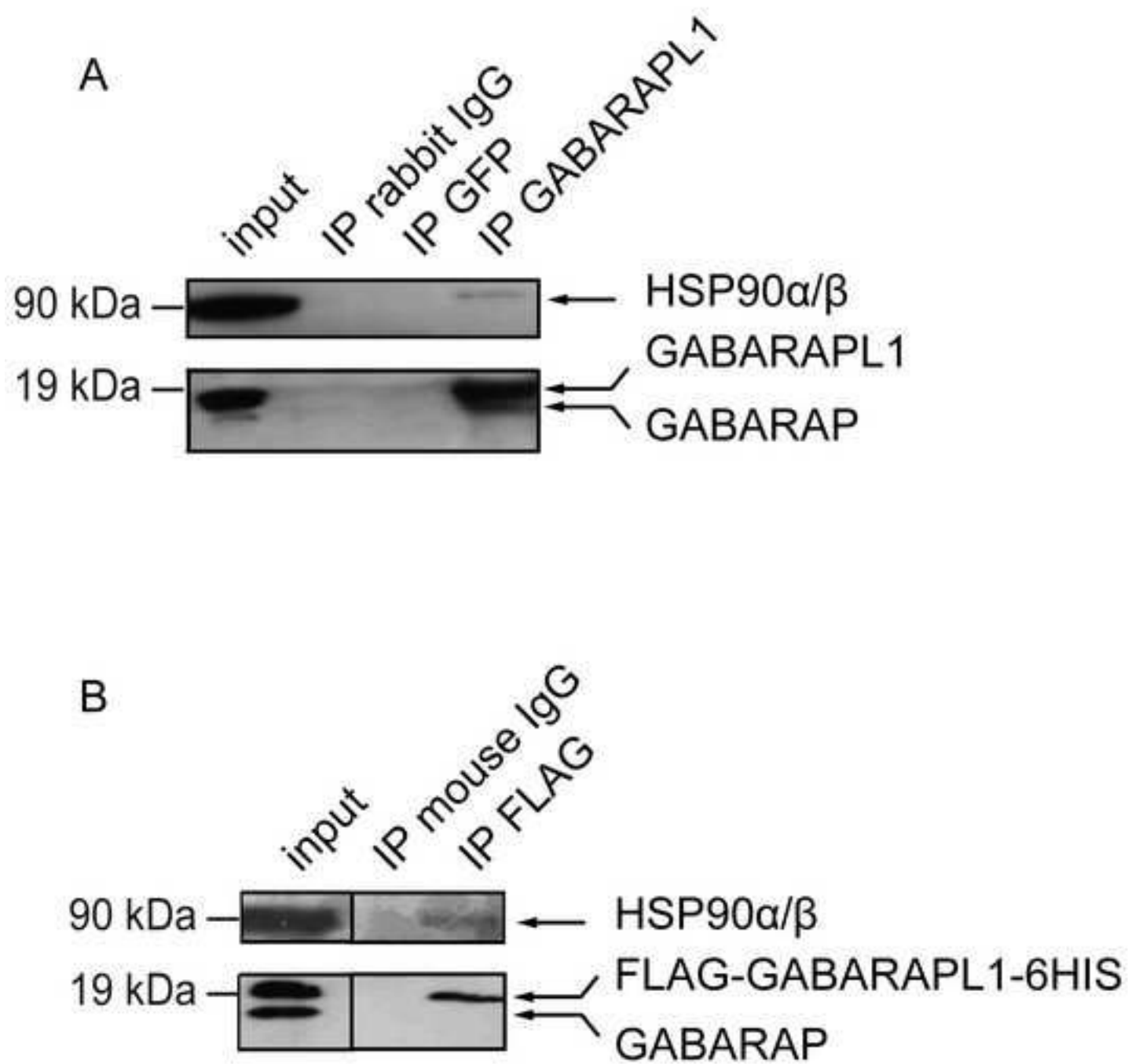
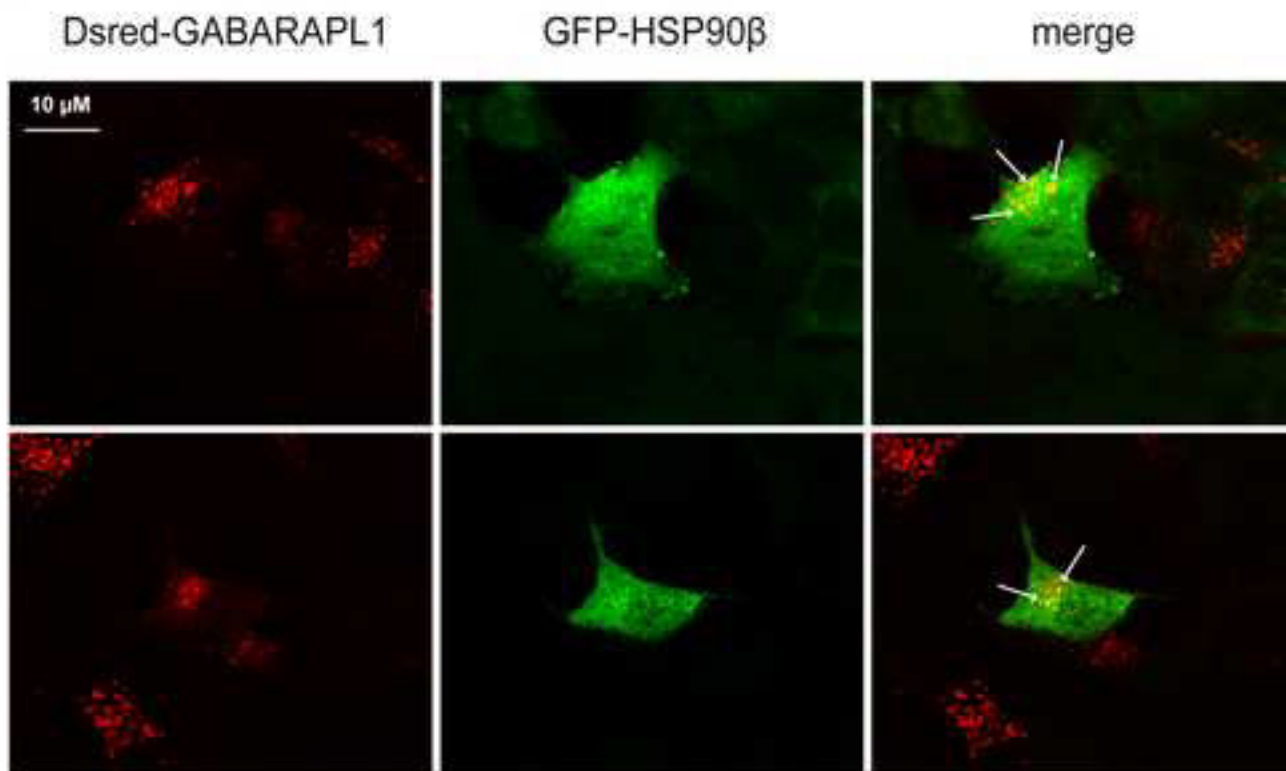


Figure 4

A



B

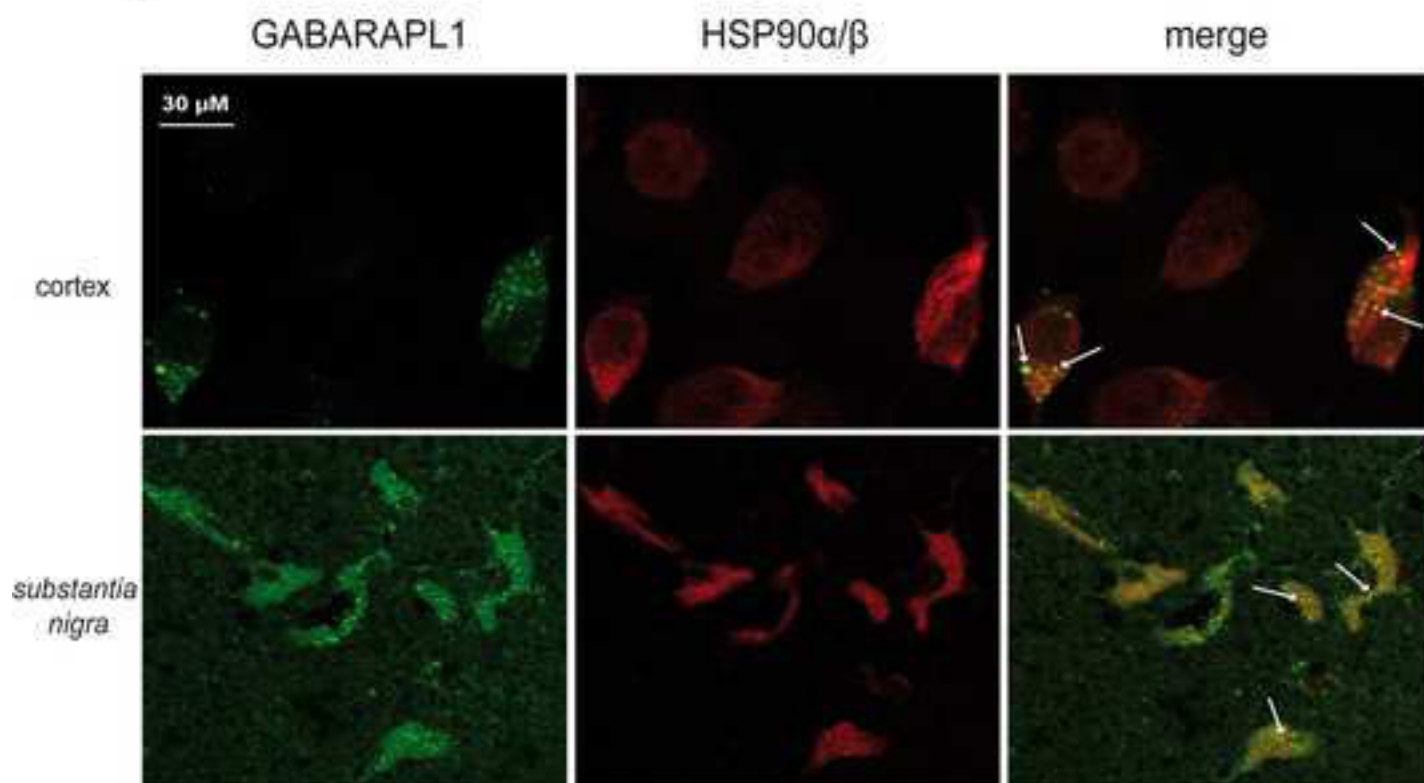


Figure 5

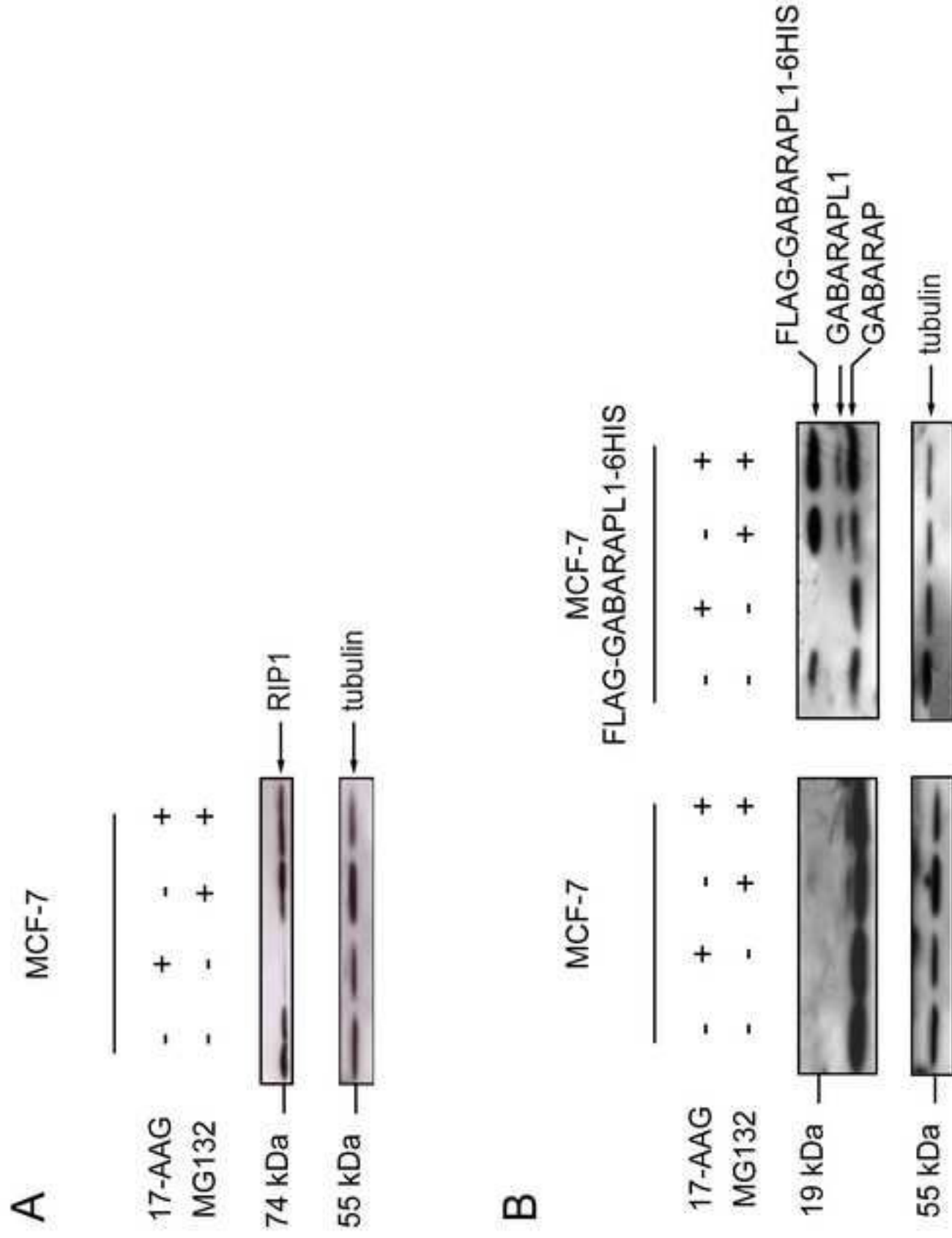


Figure 6

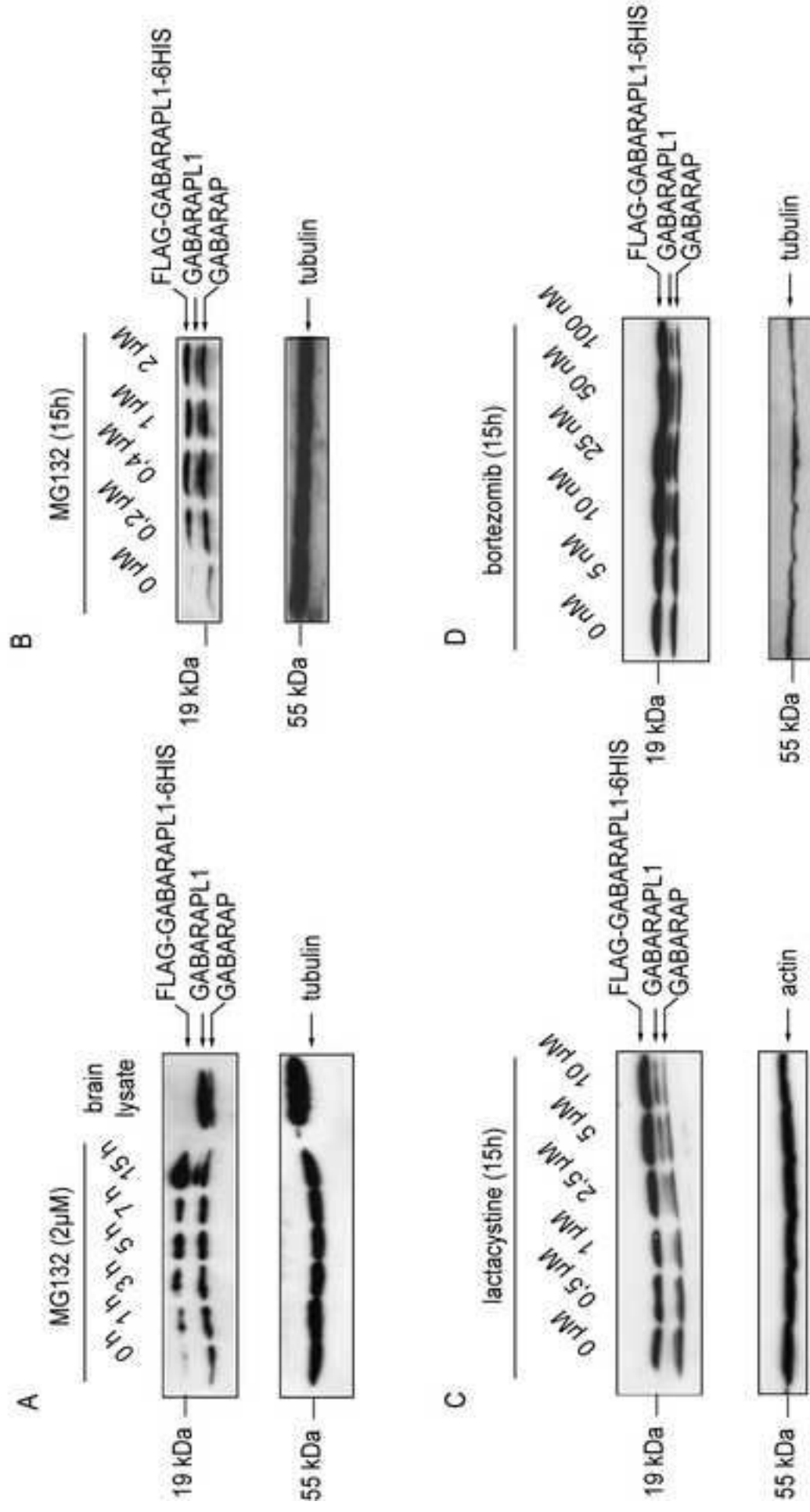
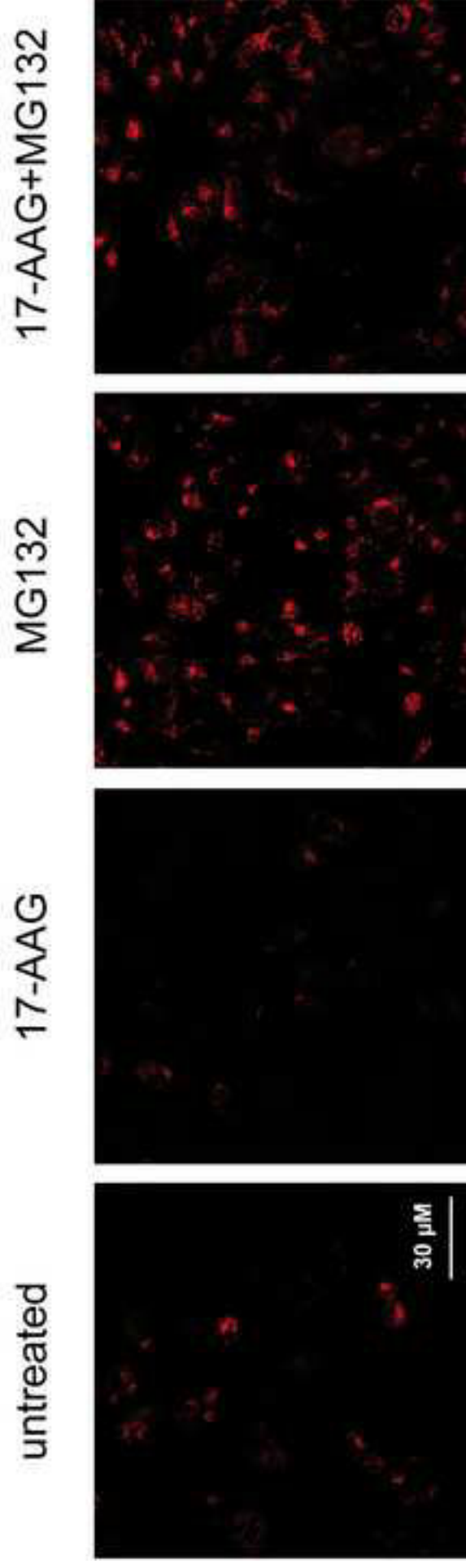


Figure 7



Communications orales

- 1). **Chakrama FZ.**, Seguin-Py S., Le Grand JN., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Despouy G., Perez V., Jouvenot M. and Boyer-Guittaut M. « Caractérisation du rôle de la protéine GABARAPL1 au cours de l'autophagie. » *Forum des Jeunes Chercheurs*, juin 2010 (Besançon, France).

- 2). **Chakrama FZ.**, Seguin S., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Jouvenot M. and Boyer-Guittaut M. « Rôle de GEC1 au cours de l'autophagie. » *Forum des Jeunes Chercheurs*, juin 2009 (Dijon, France).

- 3). **Chakrama FZ.**, Seguin S., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Jouvenot M. and Boyer-Guittaut M. « GEC1 : Un nouvel effecteur de l'autophagie. » *Journée de l'IFR133*, novembre 2009 (Besançon, France).

- 4). **Chakrama FZ.**, Seguin S., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Jouvenot M. and Boyer-Guittaut M. « GEC1 et autophagie. » *Séminaire interne de l'IFR133*, avril 2008, (Besançon, France).

Communications affichées

“GABARAPL1: a novel protein associated with autophagic vesicles and implicated in tumor progression.”

*68th Harden Conference, Autophagy: from molecules to diseases, Septembre 2010,
Cirencester, UK*

GABARAPL1: A novel protein associated with autophagic vesicles and implicated in tumor progression

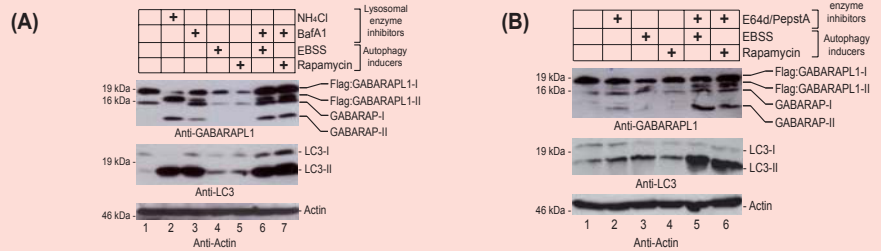
FZ. Chakrama, E. Jacquin, S. Seguin-Py, JN. Legrand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot and M. Boyer-Guittaut*

* Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, Université de Franche-Comté, UFR-ST, Besançon, France

Introduction :

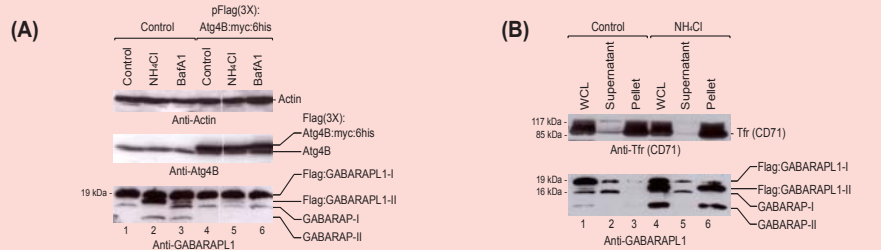
GABARAPL1 belongs to the GABARAP protein family due to its high sequence homology with GABARAP, GATE 16 and LC3. Several studies have shown that some proteins of GABARAP family are involved in autophagy, a mechanism of cellular degradation characterized by the formation of autophagosomes. We recently demonstrated that, like GABARAP and LC3, GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles (Chakrama *et al.*, 2010). Thus, GABARAPL1 can now be considered as an effector of the autophagic process. Furthermore, *gabarapl1* mRNA is weakly expressed in breast cancer and its high expression is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer (Berthier *et al.*, 2010). Given that the autophagic process is known to be involved in tumor progression (Chen and Debnath, 2010) and response to drugs used in the treatment of cancer (John *et al.*, 2008), we hypothesize that GABARAPL1 might regulate the response to anti-cancerous treatments through its role in autophagy.

Fig1: GABARAPL1 is conjugated to phospholipids



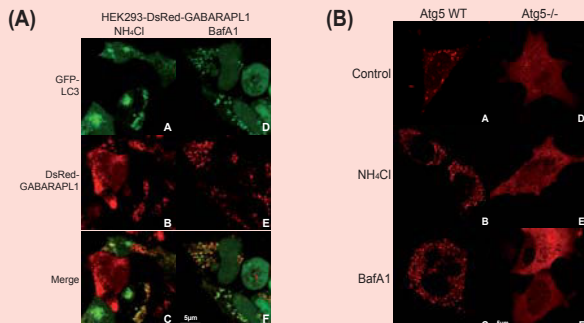
HEK293-Flag:GABARAPL1:6his cells were cultured in the presence of autophagy inducers (Rapamycine or EBSS) with or without (A) a lysosomal inhibitor (BafA1) or (B) lysosomal enzyme inhibitors (E64d/PepstatinA). Total proteins were then immunoblotted using anti-GABARAPL1, anti-LC3 and anti-Actin antibodies.

Fig2: GABARAPL1 is delipidated by Atg4B and associates with vesicles



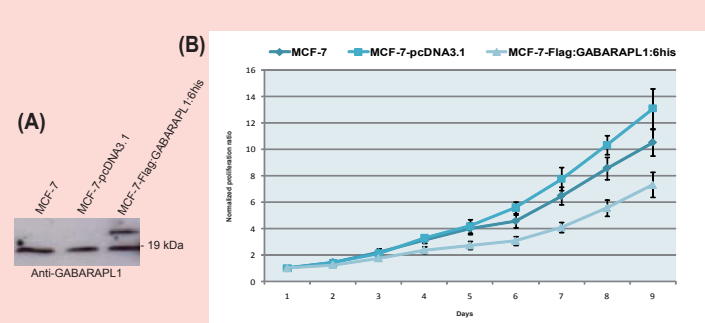
(A) HEK293-Flag:GABARAPL1:6his cells were transfected with a control or an Atg4B-expressing vector. 48 h later, cells were cultured with NH4Cl or BafA1. Total proteins were then immunoblotted using anti-GABARAPL1, anti-Actin and anti-Atg4B antibodies. (B) HEK293-Flag:GABARAPL1:6his cells were cultured with NH4Cl. Cell lysates were then ultracentrifuged at 100 000g for 1h and proteins were immunoblotted using anti-GABARAPL1 and anti-Tfr antibodies.

Fig3: GABARAPL1 associates with autophagosomes



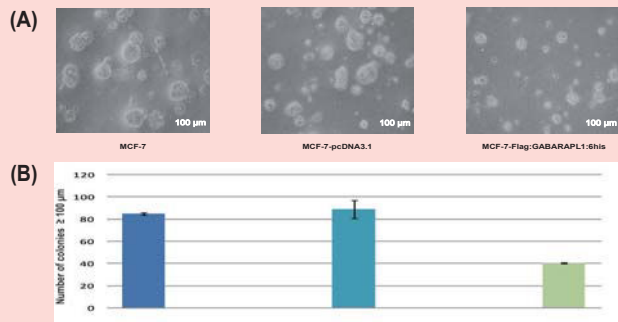
(A) HEK293-DsRed-GABARAPL1 cells were transfected with a GFP-LC3-expressing vector. 48h later, cells were incubated with NH4Cl (A,B, C) or BafA1 (D,E,F). (B) Atg5 WT and Atg5^{-/-} MEF cells were transfected with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector and treated as described in (A).

Fig4: GABARAPL1 inhibits MCF-7 proliferation rate



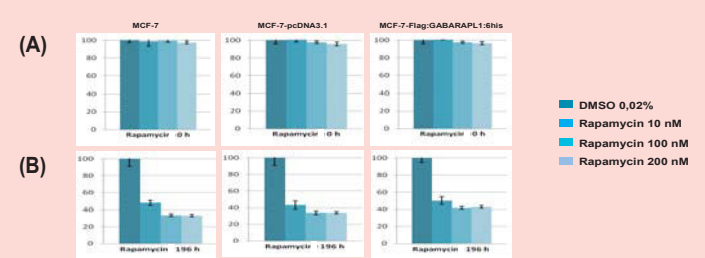
(A) Western blot analysis of MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and MCF-7-Flag:GABARAPL1:6his using an anti-GABARAPL1 antibody. (B) The proliferation rate of the MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and MCF-7-Flag:GABARAPL1:6his cell lines was assessed using the MTT reagent.

Fig5: GABARAPL1 inhibits MCF-7 growth on soft agar



(A) MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and MCF-7-Flag:GABARAPL1:6his cell lines were cultured on 1% of noble agar. (B) The number of colonies (> 100 µm) was counted using a phase contrast microscope after 21 days.

Fig6: GABARAPL1 does not regulate MCF-7 response to Rapamycin treatment



MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and MCF-7-Flag:GABARAPL1:6his were incubated with different concentrations of Rapamycin or with DMSO (control). The proliferation rate of the cell lines was then assessed using the MTT reagent. Representative results obtained at 0h (A) and 196h (B) are shown above.

In this study, we showed that :

- GABARAPL1 is implicated in the autophagy process,
- its overexpression inhibits the proliferation rate of MCF-7 but does not induce cell death (data not shown),
- its overexpression does not regulate Rapamycin effect on cell death or survival.

In the future, we will:

- analyse the expression of *gabarapl1* and GABARAPL1 in breast tumors,
- analyse the effect of GABARAPL1 overexpression on tumor cell proliferation *in vivo*.

“GEC1 (GABARAPL1): a new effector of the autophagy process.”

EMBO conference on Autophagy, octobre 2009, Ascona, Suisse.

GEC1 (GABARAPL1) : a new effector of the autophagy process

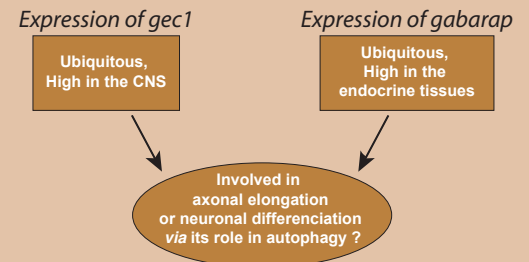
FZ. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot and **M. Boyer-Guittaut***

* Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, Université de Franche-Comté, UFR-ST, Besançon, France
Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr

Introduction :

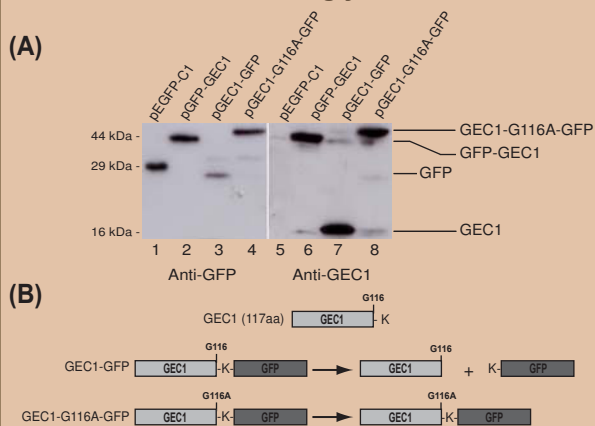
- GEC1 (117aa) shares 86% homology with GABARAP
- GEC1 is a member of the GABARAP family (GABA_A receptor associated protein)
- GEC1 interacts with GABA_AR and tubulin and promotes tubulin polymerization
- *gac1* mRNAs are detected in neurons involved in somatomotor and neuroendocrine functions but weakly expressed in sensory and reticular structures

Aim : Is GEC1, like GABARAP and LC3, involved in the autophagy process ?

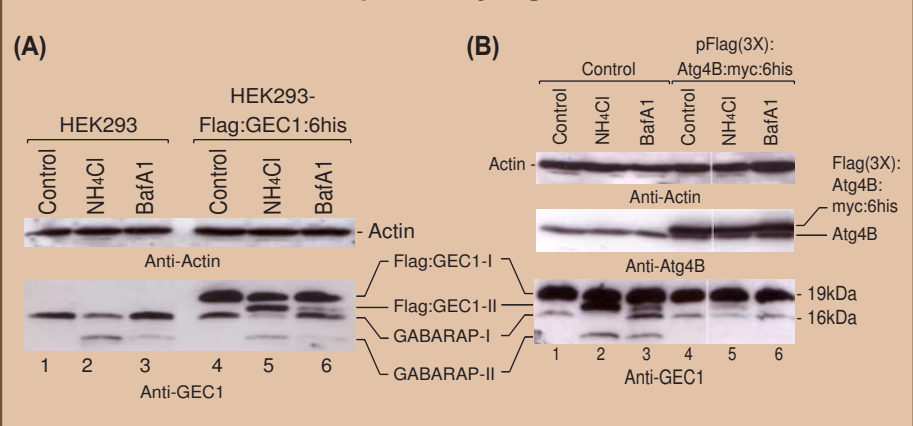


Results :

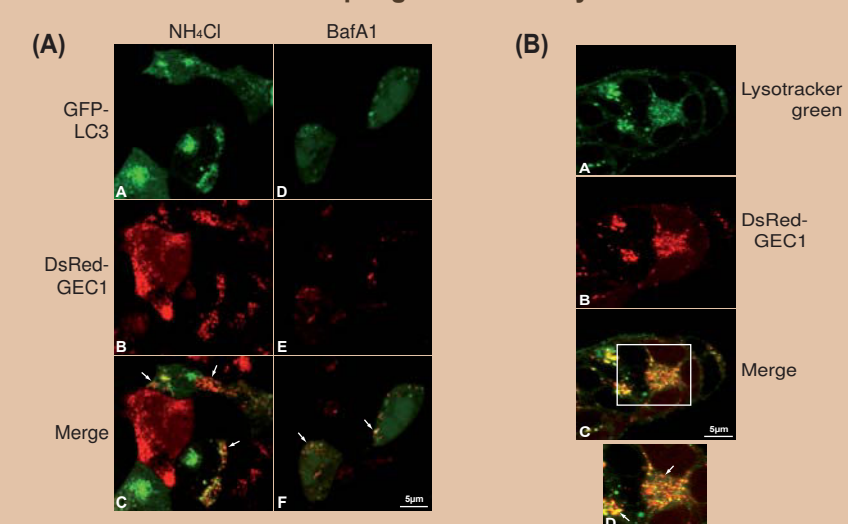
• GEC1 is cleaved at the glycine 116 in the cells



• GEC1 is modified and delipidated by Atg4B in the cells



• GEC1 is localized in autophagosomes and lysosomes in the cells



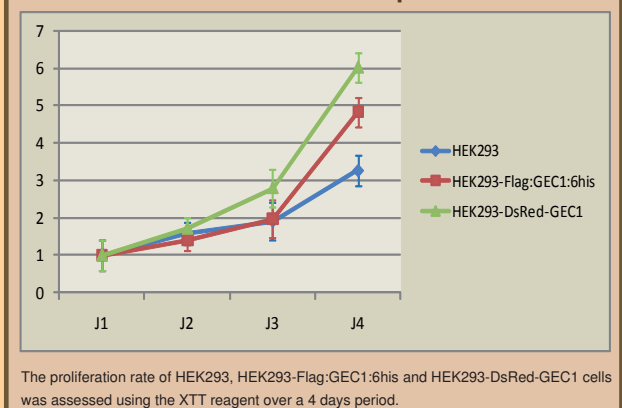
(A) HEK293-DsRed-GEC1 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector and then incubated in DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH₄Cl for 2 h (A, B, C) or in complete medium with 500 nM BafA1 for 24 h (D, E, F). (B) HEK293-DsRed-GEC1 cells were incubated in complete medium supplemented with 50 nM Lysotracker green for 1 h. Bottom image (D) corresponds to a 2-fold magnification of the selected area (white square).

Perspectives :

Since *gac1* expression is predominant in the CNS and HEK293 have been recently described to be neuronal cells, future studies will concentrate on :

- 1) How is GEC1 involved in autophagy ? Link with microtubules ?
- 2) The function of GEC1 in neuronal cells *in vitro* and in a rat model *in vivo*.
- 3) The study of neurodegenerative disease models in which autophagy is playing an important role.

• GEC1 activates HEK293 cell proliferation



Conclusions :

- 1) GEC1, like the other members of the GABARAP family, is an effector of the autophagy process : it is cleaved, linked onto phospholipids, delipidated by Atg4B and localized to autophagosomes and lysosomes in the cells.
- 2) Overexpression of GEC1 in HEK293 cells activates their proliferation rate.

“GEC1: a new autophagy effector highly expressed in the SNC.”

IV Meeting on the molecular mechanisms of neurodegeneration, mai 2009, Milan, Italie.

GEC1 : A new autophagy effector highly expressed in the CNS

Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot, Michaël Boyer-Guittaut

Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, UFR-Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté,

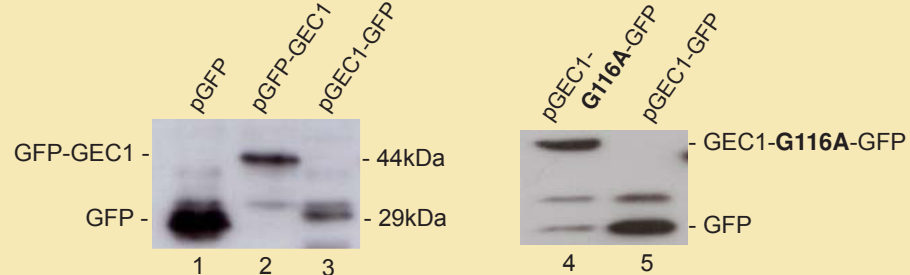
16 route de Gray, 25035 Besançon Cedex, France



Introduction

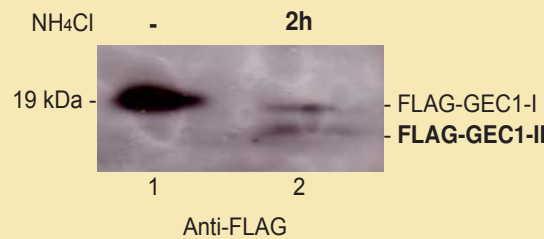
The gene *gac1* (Glandular epithelial cell 1) was first identified in our laboratory as an early and positively estrogen-regulated gene. The GEC1 protein (117aa) shares a very high homology with the proteins of the GABARAP family (GABA_A Receptor-Associated Protein) such as GABARAP, GATE16 and LC3. It has been demonstrated that, like GABARAP, GEC1 interacts with tubulin and the GABA_A receptor and promotes its intracellular transport. Furthermore, *gac1* mRNAs are highly expressed in the CNS (central nervous system), particularly in the pons and the diencephalon. In these structures, *gac1* mRNAs are detected in neurons involved in somatomotor and neuroendocrine functions but weakly expressed in sensory and reticular structures. It is well known that autophagy, a degradation pathway, is involved in many biological processes, such as cancer and neurodegenerative diseases. Since the GABARAP family members are important effectors of this process and that GEC1 shares a high identity with these factors, we wondered whether this protein might also be involved in the autophagy process.

Fig. 1 : GEC1 is cleaved in the cells and the Glycine 116, conserved in all members of the family, is the site of maturation



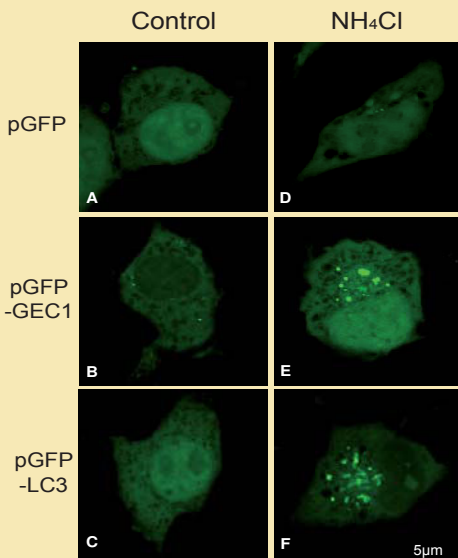
HEK293 cells were transfected with pGFP (1), pGFP-GEC1 (2), pGEC1-GFP (3,5) and pGEC1-G116A-GFP (4) vectors. 48h after transfection, cells were lysed and total proteins were separated on a 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti-GFP antibody and the ECL Plus reagent.

Fig. 2 : GEC1 is conjugated to phospholipids after induction of autophagy



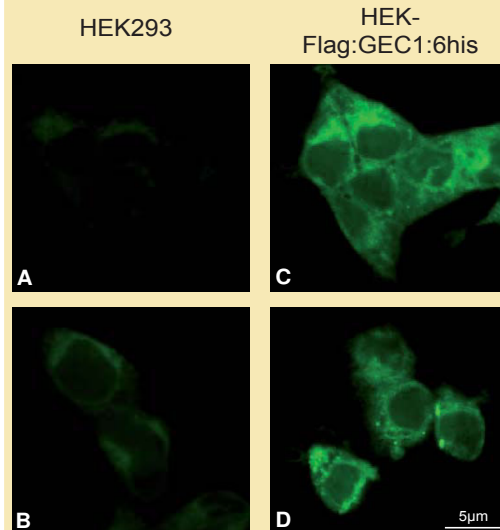
HEK-Flag:GEC1:6his cells were cultured in DMEM supplemented with 1% FCS and 50mM NH₄Cl for 2h to induce autophagy. Cells were then lysed and total proteins were separated on a 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti-Flag antibody and the ECL Plus reagent.

Fig. 3 : GFP-GEC1 is relocated into intracellular vesicles after induction of autophagy



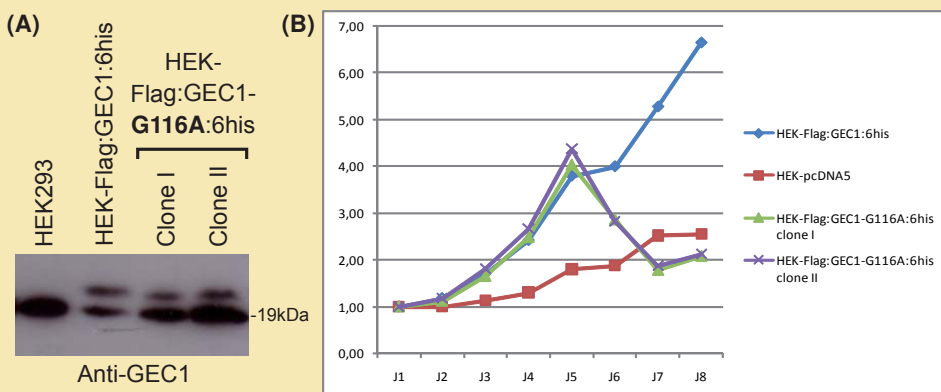
COS7 cells transfected with the pGFP, pGFP-GEC1 or pGFP-LC3 vector were incubated in complete medium (Control) (A,B,C) or complete medium supplemented with 50mM of NH₄Cl for 2h (Induced) (D,E,F). Cells were then analysed by confocal microscopy.

Fig. 4 : GEC1 regulates the basal level of autophagy in the cells



Control HEK293 (A,B) and stable HEK-Flag:GEC1:6his (C,D) cells were incubated with MDC (50μM) for 10min. at 37°C. Cells were then fixed with 2% PFA and washed with PBS. MDC fluorescence was detected by confocal microscopy.

Fig. 5 : GEC1 regulates HEK293 cell proliferation



(A) Western blot analysis of HEK293, HEK-Flag:GEC1:6his and HEK-Flag:GEC1-G116A:6his cells using an anti-GEC1 antibody and the ECL Plus reagent. (B) The proliferation rate of the HEK-pcDNA5,

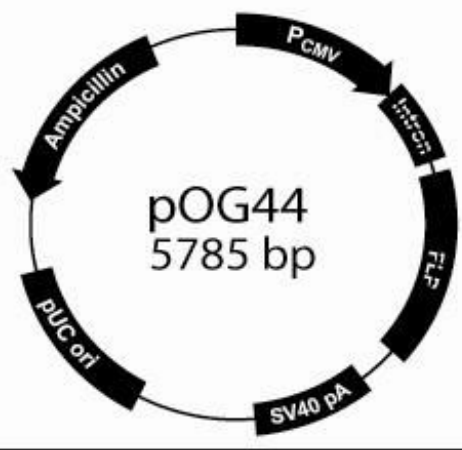
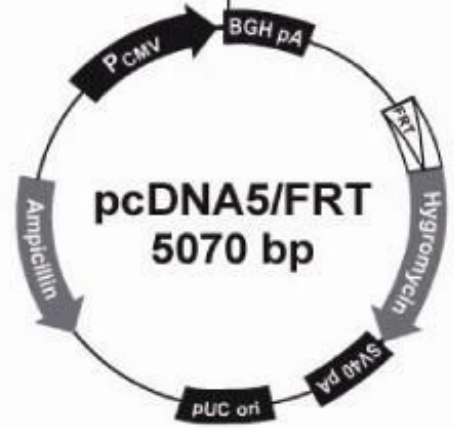
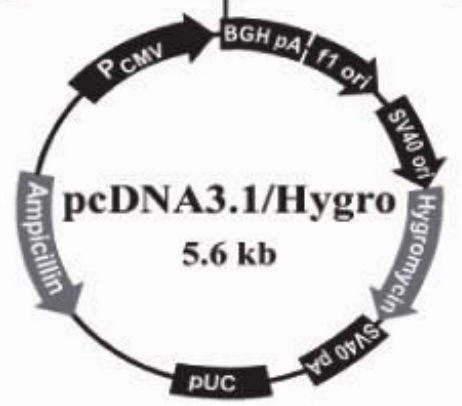
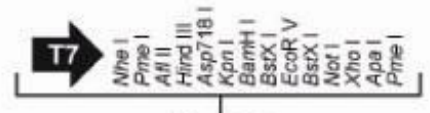
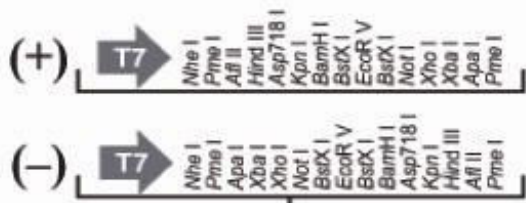
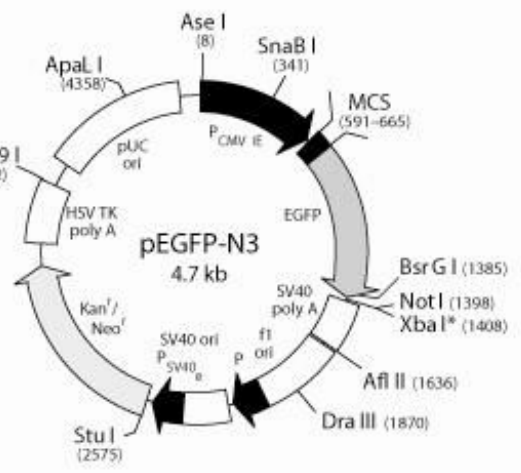
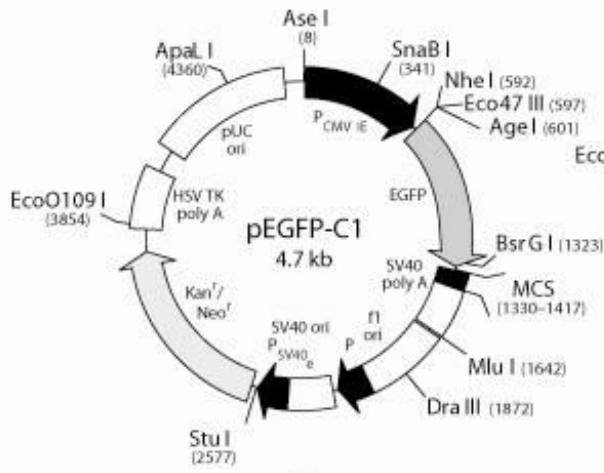
Prospects

In this study, we demonstrated for the first time that GEC1, like the other members of the GABARAP family, is an effector of the autophagy process.

Moreover, we showed that the overexpression of GEC1 in HEK293 cells activates their proliferation rate but also increases autophagic basal levels. These biological consequences are linked to the autophagy pathway since the mutation G116A abolishes these effects.

Since GEC1 expression is predominant in the CNS, future studies will concentrate on the fonction of GEC1 in neuronal cells *in vitro* and in a rat model *in vivo*. We will particularly study the neurodegenerative diseases in which autophagy is supposed to play an important role.

Annexes



Le gène *gcl/gabarapl1* a été identifié au sein de notre laboratoire comme un gène régulé positivement par les estrogènes. Il appartient à la famille *atg8* et à la sous-famille *gabarap* incluant les gènes *gabarap*, *gabarapl2* et *gabarapl3* qui codent des protéines de 117 acides aminés présentant de fortes homologies de séquences. Des études menées sur l'expression et la régulation du gène *gabarapl1* ont montré que ce gène est exprimé dans tous les tissus avec une prédominance dans le système nerveux central. De plus, *gabarapl1* s'exprime très faiblement dans les lignées et tissus cancéreux et sa forte expression est corrélée un facteur de bon pronostic dans les tumeurs du sein. L'étude fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 a montré qu'elle est impliquée dans le transport de plusieurs récepteurs et plus particulièrement le récepteur GABA_A et le récepteur des κ -opioïdes *via* son interaction avec la tubuline et la protéine NSF. Cependant, très peu de partenaires spécifiques de GABARAPL1 ont été identifiés à ce jour, et de ce fait, le rôle de GABARAPL1 reste encore mal connu. Cependant, il a été décrit que les protéines de la famille Atg8 sont impliquées dans l'autophagie, un mécanisme de dégradation et de survie cellulaire, qui se caractérise par la formation de doubles membranes appelées autophagosomes. Le rôle majeur de ce processus est de maintenir l'homéostasie cellulaire mais il a été rapporté que ce processus est également impliqué dans plusieurs pathologies.

Les objectifs de mon travail étaient, d'une part, de caractériser le rôle de la protéine GABARAPL1 au cours de l'autophagie et, d'autre part, de caractériser son expression dans des lignées et tissus cancéreux et sa régulation en réponse à des composés anti-cancéreux. Tout d'abord, nous avons montré que GABARAPL1 est clivée dans les cellules par la protéase Atg4B au niveau de sa glycine 116 C-terminale avant sa conjugaison à des phospholipides. Cette forme modifiée, lipidée, est localisée à la surface des autophagosomes et des lysosomes.

Nous avons ensuite montré que la protéine GABARAPL1 est faiblement exprimée dans de nombreuses lignées cancéreuses, en particulier celles dérivées de patients atteints de leucémies ou de cancer du sein. L'expression de la protéine est également altérée dans les tissus pathologiques et notamment dans les méningiomes. En effet, elle présente une faible expression dans les méningiomes de grade I psammomateux par rapport aux autres types de méningiomes. Enfin, nous avons montré que l'expression de GABARAPL1 est régulée par des inhibiteurs du protéasome utilisés en thérapie anti-cancéreuse mais nous n'avons pas pu montrer, à l'heure actuelle, d'effet de la surexpression de GABARAPL1 sur l'action de ces drogues.

Nos travaux ont donc permis de montrer, pour la première fois, que la protéine GABARAPL1 est associée à des vésicules autophagiques. Des expériences préliminaires ont également montré que GABARAPL1 est surexprimée dans des cellules primaires en l'absence de son homologue GABARAP. Enfin, nous avons montré que, contrairement à GABARAP, l'expression de la protéine est régulée dans différentes lignées cellulaires et dans des tissus tumoraux (sein et méningiomes). Ces résultats nous permettront de poser les hypothèses de nos futurs travaux.

Mots clés : GABARAPL1, GABARAP, LC3, macroautophagie, tumeurs du sein, méningiomes, résistance aux drogues anti-cancéreuses, protéasome.

The *Gec1/gabarapl1* gene was identified in our laboratory as an early estrogen regulated gene. *Gabarapl1* belongs to the *gabarap* family, also including *gabarap*, *gabarapl2* and *gabarapl3* genes, that encode proteins containing 117 amino acids each and present high sequence homology with each other. Studies on the expression and regulation of the *gabarapl1* gene showed that it is expressed in all tissues, predominantly in the central nervous system. Moreover, *gabarapl1* is expressed very weakly in cancer cell lines and cancerous tissues and its high expression is correlated with a good prognostic factor for breast tumor patients. A functional study of the GABARAPL1 protein showed that this protein is involved in the transport of cellular receptors such as the GABA_A and κ-opioid receptors *via* its interaction with tubulin and NSF. However, very few specific GABARAPL1 partners have been identified to date and the role of GABARAPL1, therefore, still unknown. It has been reported that the Atg8 family proteins are involved in autophagy, a mechanism of degradation and cell survival that is characterized by the formation of double membranes called autophagosomes. While the major role of this process is to maintain cellular homeostasis, autophagy is also involved in several pathologies.

The aims of my research were, firstly, to characterize the role of the GABARAPL1 protein during autophagy and, secondly, to study its expression in cancer cell lines and cancerous tissues and its regulation in response to anti-cancer drugs. First, we showed that GABARAPL1 is cleaved in cells by protease Atg4B at its 116 C-terminal glycine residue prior to its conjugation to phospholipids. This modified form, lipidated, is located on the surface of autophagosomes and lysosomes. We then showed that GABARAPL1 expression is reduced in many cancer cell lines, particularly those derived from patients with leukemia or breast cancer. GABARAPL1 expression is also altered in pathological tissues and especially in meningiomas. Indeed, its low expression is observed in grade I psammomatous meningiomas compared to other types of meningiomas. Finally, we showed that GABARAPL1 expression is regulated by proteasome inhibitors used in cancer therapy, but we could not show, at present, if the overexpression of GABARAPL1 affects the action of these drugs.

Thus, our results demonstrated for the first time that the GABARAPL1 protein is associated with autophagic vesicles. Preliminary experiments also showed that GABARAPL1 is overexpressed in primary cells in the absence of its counterpart, GABARAP. Finally, we showed that, contrary to GABARAP, GABARAPL1 protein expression is differentially expressed in different cell lines and tumor tissues (breast and meningioma). These results allow us to propose hypothesis for future work.

Key words: GABARAPL1, GABARAP, LC3, macroautophagy, breast tumors, meningiomas, anti-cancer drugs resistance, proteasome.