



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 par identification de nouveaux partenaires protéiques et étude de l'expression de gabarapll dans les cancers du sein

Stéphanie Seguin-Py

► **To cite this version:**

Stéphanie Seguin-Py. Caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 par identification de nouveaux partenaires protéiques et étude de l'expression de gabarapll dans les cancers du sein. Cancer. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3008 . tel-01622211

HAL Id: tel-01622211

<https://theses.hal.science/tel-01622211>

Submitted on 24 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

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA
PROTEINE GABARAPL1 PAR IDENTIFICATION DE
NOUVEAUX PARTENAIRES PROTEIQUES ET
ETUDE DE L'EXPRESSION DE *gabrapl1* DANS LES
CANCERS DU SEIN**

THESE

Soutenu le 13 juillet 2011

Par

Stéphanie SEGUIN-PY

Née le 21 juillet 1983 à Champagnole (39)

Membres du Jury :

- **Rapporteurs :**
Mme **L. Dubrez-Daloz**, Chargée de recherche, HDR-Université de Bourgogne
Mme **I. Pellerin**, Professeur-Université de Rennes 1
- **Examineur :**
M. **F. Pralong**, Professeur ordinaire-CHU Vaudois-Université de Lausanne
- **Directeur de thèse :**
M. **R. Delage-Mourroux**, Professeur-Université de Franche-Comté
- **Co-directeur de thèse :**
Mme **A. Fraichard**, Maître de Conférences-Université de Franche-Comté

Mes premiers remerciements sont adressés aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail malgré leurs nombreuses obligations: le Professeur Isabelle Pellerin et le Docteur Laurence Dubrez-Daloz en tant que rapporteurs et le Professeur François Pralong en tant qu'examinateur. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porté à ce travail.

La réalisation de cette thèse fut une occasion inespérée de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Elles ont chacune, à des degrés divers, apporté une contribution positive à sa finalisation. Je tiens ainsi à toutes les remercier pour leurs conseils et leurs soutiens pendant cette thèse.

Je pense tout d'abord particulièrement à mes directeur et co-directeur de thèse :

Régis, merci pour les conseils et les idées pertinentes que tu as pu avoir tout au long de ces années. Tes remarques successives ont permis d'améliorer les différentes versions de ce travail. En plus d'être un scientifique remarquable, tu fais preuve de grandes qualités humaines. Ta rigueur, ton humilité, ta patience, ton respect, sans oublier ton sens de l'humour à toute épreuve, font que je me suis toujours sentie à l'aise et que j'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés.

Annick, je t'admirais déjà pendant mes années d'étudiante pour ta coordination (tu sais de quoi je parle...) et tes enseignements très clairs et structurés. Je t'admire encore plus aujourd'hui pour tes nombreuses autres qualités. Je suis vraiment heureuse d'avoir été ton étudiante, tu as toujours été présente pour moi durant cette thèse, aussi bien au niveau professionnel que personnel. Tu m'as continuellement guidée et tu as toujours su me remotiver quand le moral était au plus bas. Parfois je me demande si j'aurais continué sans toi... Je te souhaite de t'épanouir au laboratoire et te souhaite plein de bonheur avec ta jolie famille. Tu peux me donner quand tu veux ta petite Perrine à garder. J'espère sincèrement qu'on gardera contact. En tout cas, tu me manqueras beaucoup au quotidien.

Je remercie également le Professeur Michèle Jouvenot, directrice de l'équipe EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Je garderai toujours en mémoire vos enseignements prodigués d'une façon inégalée durant mes années d'étudiante.

Je vais maintenant m'adresser individuellement aux membres du laboratoire qui ont partagé le plus de moments avec moi :

Commençons par les gec1...

Fatima, tu es la collègue gec1 avec laquelle j'ai partagé le plus de temps. Nous nous sommes beaucoup rapprochées au fil des années et j'en suis très contente. Nous n'avons pas cédé à la concurrence qui aurait pu s'installer entre nous. Je suis particulièrement heureuse d'avoir partagé l'étape de rédaction et de préparation de l'oral avec toi. Je me suis sentie ainsi

moins seule dans ces difficiles moments. J'espère que tu réussiras en post-doc à Lyon. Je regretterai nos petits cinés mais j'espère qu'on se reverra quand tu reviendras sur Besançon.

Nicole, tu es arrivé de ton Canada natal pour découvrir la France et les Français !!! J'espère avoir un peu contribué à cette découverte en t'apprenant des expressions bien de chez moi. Tu as su t'intégrer rapidement avec ton petit accent (de moins en moins prononcé...) et ton humour malgré toi par l'utilisation de mots pas toujours appropriés à la situation ! Je sais que le Canada te manque parfois mais tu restes malgré tout toujours de bonne humeur. Je te souhaite plein de bonheur avec Vincent.

Continuons avec les QSOX,

Nicolas, tu as été pendant longtemps l'unique QSOX et surtout l'unique garçon du laboratoire. Tu en as d'ailleurs beaucoup profité... Nous avons toujours entretenu de bonnes relations malgré nos petites scènes de ménage assez récurrentes. Je suis heureuse d'avoir partagé le bureau avec toi. J'ai aimé qu'on puisse se conseiller mutuellement au niveau technique même si nous n'étions pas toujours d'accord. Tu as toujours su me faire rire (il faut dire que je suis bon public...) et me remonter le moral. Merci également de m'avoir tenue compagnie jusqu'à parfois tard le soir et d'avoir relu ma thèse. Je sais ce que tu vaudras et je suis sûre que tu auras bientôt une vie professionnelle à la hauteur que celle que tu mérites. Bonne fin de thèse.

François, nous ne nous serons pas connus longtemps mais tu as tout de suite su te faire apprécier grâce à ton humour un peu particulier ! Désolée mais je pense que la co-location n'est plus envisageable... Je te souhaite de trouver une super thèse et continue les scouts, d'accord ?

Gilles, tu es la dernière recrue QSOX et quelle recrue !!! Tu as été pour moi d'une aide considérable pour les IP et je t'en remercie beaucoup. Tu es à l'écoute des gens et particulièrement des étudiants et en plus toujours de bonne humeur. Bonne chance à toi pour la suite.

Continuons avec ma copine Sophie du labo d'histo,

Sophie, nous nous connaissons maintenant depuis bien longtemps et nous sommes depuis quelques années devenues amies. Je suis heureuse que nous ayons passé ces années de thèse ensemble, j'ai une totale confiance en toi et je sais que je peux toujours compter sur toi. Merci de m'avoir aidée pour les immuno et de t'être libérée pour venir avec moi au microscope confocal. Cette année de demi-ATER à tes côtés était sympa et nous a encore plus rapproché. Tu feras une formidable chercheuse (grâce à ton « mental »...), tes futurs collègues auront bien de la chance. Bon post-doc aux States et sois heureuse avec ton Jean-Si.

Je voudrais désormais remercier tout particulièrement Valérie et Martine,

Valérie, LA TECHNICIENNE du labo !!! Tu ne peux pas imaginer comme tu as été d'une grande aide pour moi pendant cette thèse même si je sais que tu aurais encore aimé en faire plus. Je suis vraiment contente d'avoir assisté à ton élévation au grade de technicienne ! Tu m'as souvent manquée cette dernière année, et en particulier nos innombrables fous rires, mais c'était pour la bonne cause... Je suis sûre que nous continuerons à nous voir de temps en temps. Profite bien de la fin de ton congé maternité.

Martine, tu as toujours été disponible pour moi, pour passer des coups de fil ou envoyer des papiers. J'apprécie énormément ta gentillesse et ta sérénité. Nos petites conversations à mon arrivée le matin me manqueront... Bonne fin de carrière et pense à moi pour ton départ en retraite !

Au tour de mes stagiaires préférés,

Elodie, tu prends la relève chez les gec1... Je suis fière d'avoir assisté à ton parcours, il y a eu beaucoup de chemin de fait depuis le BTS et il fallait du courage. Tu m'as beaucoup aidée dans mes manips sans jamais te plaindre. Je suis contente d'avoir été ton « chef » pendant tes différents stages. Merci pour ce que tu as fait pour moi. Cette fois c'est à toi de tenir compagnie à Nicolas dans le bureau... Bon courage, je suis persuadée que tu vas réussir ton M2.

Romain, tu n'es pas resté longtemps en stage au laboratoire mais tu m'as marquée, certainement car tu étais mon premier stagiaire et que lors de ton premier jour tu as regardé mon tube coulé... Tu vas faire une super thèse à l'EFS et bientôt je viendrai te voir, toi aussi, aux States !

Je remercie également tous les membres de l'équipe E₂SNC que je n'ai pas encore cités: Michael pour ton sens de l'ordre et du rangement, Pascale pour ton enthousiasme et la passion qui t'anime, Jean pour ta bonne humeur communicative, Mai pour m'avoir tenue compagnie le soir très tard, Elodie Bedel, tu es une vraie bosseuse et j'ai beaucoup apprécié ta compagnie dans le bureau et dans les labo, Anne Vejux, je pense que je ne retrouverai jamais une collègue comme toi, mais je te rassure c'est un compliment, Alex qui m'a beaucoup appris, Elise, Fabrice, Carole, Pierre-Yves, Dominique, Saïd, Hélène, Nadège, Karine, Sandrine à qui je souhaite une bonne thèse, Martine, Gabrielle, Nassima, Fabrice, Claude J., Christophe, Claude C. et Annie.

Je tiens à remercier les membres de CLIPP et en particulier Patrick, Wilfrid, Géraldine, et les inséparables Alain et Benoît.

Je remercie également mes amis : d'abord mes copines de thèse, Magalie et Carole, nos petites virées au MacDo toutes ensemble me manquent déjà, Stéphanie et Marion (mes amies depuis 25 ans cette année !), Elise et Florence (les Vesouliennes), Cyrille qui m'a permis d'avoir pour filleule la plus adorable des petites filles, et tous les autres...

Je remercie enfin et surtout ma famille, ma belle-famille et mon mari.

Maman, Papa, merci d'avoir été toujours là quand j'avais besoin de vous, c'est-à-dire presque tout le temps !!! Tout d'abord, merci d'avoir financé mes études, sans vous j'aurais été obligée de travailler et ma vie d'étudiante aurait été beaucoup plus difficile au quotidien. Merci de m'avoir laissé à Champa travailler ou me détendre selon les moments. Vous êtes les parents rêvés, ne changez pas.

Mamies, Papis, vous ne compreniez pas ce que je faisais mais pour vous je suis toujours la meilleure. Mamie Arlette, l'équipe de « c'est du propre » n'a qu'à bien se tenir ! Merci pour tout le ménage que tu as fait pour moi et maintenant tu auras un stress en moins mais à quand le prochain ? Merci à toi et Papi pour m'avoir permis de me rendre facilement à Besançon en m'achetant deux voitures surtout quand on sait ce qu'est devenue la première... Mamie et Papi de Beaune, merci pour les week-ends, souvent trop copieux et trop arrosés, passés à Beaune. Nous allons maintenant pouvoir venir encore plus souvent.

Loïc, mon frère, que je remercie pour s'être sacrifié pour moi comme il le dit souvent mais heureusement personne ne le croit.

Gérald, mon mari, qui m'a supporté et encouragé pendant toutes ces années. Merci pour avoir porté l'appartement à bout de bras, comme tu le dis si bien, ces derniers mois. Tu sais que pour moi tu es le plus merveilleux mari au monde. Une nouvelle vie va désormais commencer...

Merci aussi à tous mes oncles (mon parrain Christophe, Patou, Philippe), tantes (ma marraine Nénette, Mylène, Rachelle), grands-oncles (Pierrot, Noël), grandes-tantes (Louisa, Colette, Claude, Martine), cousins et petits cousins (Maxime, Xavier, Titouan, Antoine, Fred), cousines et petites cousines (Marianne, Esther, Iolane, Sylvie) et à mes animaux adorés (ma regrettée Indy et ma Louna).

Ma nouvelle famille et en particulier mes beaux-parents Gisèle et Jacky, ma belle-sœur Sonia, mon beau-frère Lionel et mes petits neveux adorés Paul et Robin. Merci pour les belles journées de détente passées à Arbois en votre compagnie.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS ET ACRONYMES	13
CADRE ET BUT DU TRAVAIL	19
INTRODUCTION	25
1 GABARAPL1 : SA DECOUVERTE, LE GENE, LE MESSAGEUR ET SA REGULATION	27
1.1 Découverte et organisation du gène et du messageur	27
1.2 Expression du messageur <i>gabapapl1</i>	30
1.2.1 <i>Expression dans les tissus</i>	30
1.2.2 <i>Expression dans le cerveau</i>	30
1.2.3 <i>Expression de gabapapl1 dans les pathologies : cancers et maladies neurodégénératives</i>	32
1.3 Régulation	35
1.3.1 <i>Régulation par les estrogènes</i>	35
1.3.2 <i>Régulation par les facteurs de transcription de la famille FoxO</i>	41
1.3.3 <i>Régulation par les rythmes circadiens</i>	45
1.3.4 <i>Régulation par E2F1</i>	47
2 LA PROTEINE GABARAPL1, SES HOMOLOGUES, ET LEURS FONCTIONS	48
2.1 Les protéines de la famille GABARAP	48
2.2 Localisation et expression de la protéine GABARAPL1 et de ses homologues	51
2.2.1 <i>Localisation et expression de GABARAPL1</i>	51
2.2.2 <i>Localisation et expression de Atg8, GABARAP, GATE-16 et LC3</i>	53
2.3 Les partenaires protéiques de GABARAPL1 et les fonctions cellulaires associées	55
2.3.1 <i>Partenaires impliquant GABARAPL1 dans le transport intracellulaire de récepteurs</i>	57
2.3.2 <i>Partenaires impliquant GABARAPL1 dans le processus d'autophagie</i>	68
3 LES CANCERS DU SEIN	76
3.1 Epidémiologie	76
3.2 Facteurs de risque	76
3.3 Origine cellulaire des tumeurs	77
3.4 Classification	78
3.4.1 <i>Classification histologique</i>	78
3.4.2 <i>Classification moléculaire</i>	80
3.5 Facteurs pronostiques et prédictifs influençant le choix d'un traitement	82
3.5.1 <i>Les facteurs pronostiques</i>	82
3.5.2 <i>Les facteurs prédictifs</i>	85
MATERIELS ET METHODES	87
1 MODELES ANIMAUX	89

1.1	Méthode de fixation des cerveaux de rat	89
1.2	Coupes de cerveaux de rat	89
2	MATERIELS BIOLOGIQUES	90
2.1	Vecteurs plasmidiques	90
2.1.1	<i>Vecteur pGEM-T easy</i>	90
2.1.2	<i>Vecteurs pSBet flag-gabarapl1-6his et pSBet flag-gabarap-6his</i>	90
2.1.3	<i>Vecteurs pcDNA 5/FRT flag-gabarapl1-6his et pcDNA5/FRT flag-gabarapl1-G116A-6his</i>	90
2.1.4	<i>Vecteur pOG44</i>	91
2.1.5	<i>Vecteurs pcDNA 3.1 gabarapl1 et pcDNA 3.1 flag-gabarapl1-6his</i>	91
2.1.6	<i>Vecteurs pGEX-4T2-GABARAPL1, pGEX-4T2-GABARAPL1 (22-117) et pGEX-4T3-HSP90α</i>	92
2.1.7	<i>Vecteurs pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP et pGFP-HSP90β</i>	92
2.1.8	<i>Vecteur pDsred-GABARAPL1</i>	92
2.2	Lignées cellulaires	93
2.2.1	<i>Les lignées MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-549 et ZR-75-1</i>	93
2.2.2	<i>La lignée Flp-in-HEK293</i>	93
2.2.3	<i>Les lignées MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS, HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS, MCF-7 Dsred-GABARAPL1 et HEK293 Dsred-GABARAPL1</i>	94
3	TECHNIQUES COURANTES D'AMPLIFICATION ET DE CLONAGE DE L'ADN	96
3.1	Amplification d'ADN par PCR	96
3.2	Restriction enzymatique	96
3.3	Ligature	97
3.4	Extraction des ADN plasmidiques	97
3.4.1	<i>Mini-préparation par lyse alcaline</i>	97
3.4.2	<i>Maxi-préparation</i>	97
3.5	Transformation des bactéries compétentes	97
3.6	Séquençage	98
4	CULTURE CELLULAIRE	98
4.1	Entretien des cellules	98
4.1.1	<i>Milieux de culture</i>	98
4.1.2	<i>Passage des cellules</i>	98
4.1.3	<i>Congélation et décongélation des cellules</i>	99
4.2	Transfection cellulaire	99
4.2.1	<i>Transfection transitoire</i>	99
4.2.2	<i>Transfection stable</i>	100
4.2.3	<i>Test de viabilité cellulaire</i>	100
4.3	Test de prolifération clonale en milieu semi-solide (agar mou)	101

4.4	Xénogreffes de cellules MCF-7 parentales, MCF-7 contrôle et MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS dans un modèle de souris « nude »	102
4.5	Traitements des cellules	102
5	TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ARN TOTAUX	103
5.1	Extraction des ARN totaux	103
5.2	Analyse par RT-PCR semi-quantitative	103
5.3	Analyse par RT-PCR en temps réel	104
6	TECHNIQUES POUR L'EXPRESSION, LA PURIFICATION ET L'ANALYSE DES PROTEINES	106
6.1	Extraction des protéines	106
6.2	Expression et purification des protéines de fusion	106
6.3	Techniques d'étude d'interactions protéiques	107
6.3.1	<i>GST pull-down</i>	107
6.3.2	<i>Immunoprécipitation</i>	109
6.4	Spectrométrie de masse	110
6.5	Electrophorèse SDS-PAGE	111
6.6	Western blotting	111
6.7	Immunohistochimie	112
6.8	Microscopie confocale	112
7	EXPERIENCE DE MACRO-ARRAY	113
7.1	Synthèse des sondes <i>gabarapl1</i> et <i>gabarap</i>	113
7.2	Hybridation des sondes	113
	RESULTATS	115
	PUBLICATION I	117
	High expression of <i>gabarapl1</i> is associated with better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer.	117
	PUBLICATION II	135
	Identification of HSP90 α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein.	135
	PUBLICATION III	177
	GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles.	177
	DISCUSSION CONCLUSION PERSPECTIVES	193
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	213
	ANNEXES	239
	I) REVUE	241
	II) LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES	253
	III) LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES	255

*ABBREVIATIONS
ET ACRONYMS*

17-AAG : 17-N-AllylAmino-17-demethoxyGeldanamycin	CLOCK : Circadian Locomotor Output Cycle Kaput
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CMA : Chaperone Mediated Autophagie
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	CRE : Cyclic AMP Response Element
AEBSF : 4-(2-AminoEthyl)BenzeneSulfonyl Fluoride	CRY : CRYptochrome
AKT : AKR T cell lymphoma	Ct : Cycle threshold
AMPA : 2-Amino-3-(5-Methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) Propanoic Acid	DIN : Ductal Intraepithelial Neoplasia
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
AMPK : AMP-activated Protein Kinase	DMSO : Diméthyl SulfOxyde
AP-1 : Activator Protein-1	DNase : DésoxyriboNucléase
AP-2 : Adaptor Protein-2	dNTP : désoxyriboNucléoside TriPhosphate
ARH : Autosomal Recessive Hypercholesterolemia	DTT : DiThioThréitol
ARN : Acide RiboNucléique	E₂ : estradiol-17 β
ARNm : ARN messenger	E. coli : <i>Escherichia coli</i>
ARNt : ARN de transfert	EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
AT : récepteur à l'angiotensine II	EGF : Epidermal Growth Factor
ATP : Adénosine TriPhosphate	ERE : Élément de Réponse aux Estrogènes
Atg : Autophagy-related	ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
BCL-2 : B Cell Lymphoma-2	FoxO : Forkhead box transcription factors of the O class
BCL-XL : B-Cell Lymphoma-eXtra Large	FOS : FBJ (Finkel, Biskis, and Jinkins) OsteoSarcoma
BGH : Bovine Growth Hormone	FRE : FoxO-Recognized Element
BH3 : BCL-2 Homology 3	FRT : Flp Recombination Target
BMAL1 : Brain and Muscle ARNT-Like protein 1	GABA : Gamma-Aminobutyric Acid
BNIP3L : BCL-2 and adenovirus E1B 19 kDa-interacting Protein 3-Like	GABA_A : Gamma-AminoButyric Acid type A receptor
BRCA : BReast CAncer	GABARAP : GABA _A Receptor-Associated Protein
CEGE : Cellules Epithéliales Glandulaires d'Endomètre de Cobaye	GABARAPL : GABARAP like
Chx : cycloheximide	

GADD45α : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45 α	MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts
GAP : GTPase-Activating Protein	MG132 : carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
GATE-16 : Golgi-associated ATPase Enhancer of 16 kDa	M-MLV RT : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
GEC1 : Glandular Epithelial Cell 1	MPTP : 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-TetrahydroPyridine
GFP : Green Fluorescent Protein	MST1 : Mammalian Ste20-like Kinase 1
GRIP1 : Glutamate Receptor Interacting Protein 1	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
GST : Glutathion S-Transférase	MYC : MYeloCytomatosis oncogene
HA : HémAgglutinine	NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
HCCA : α -Cyano-4-HydroxyCinnamic Acid	NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	NBR1 : Neighbour of BRCA1
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2	NMDA : N-Methyl-D-Aspartate
HSP : Heat Shock Protein	NP-40 : Nonidet P-40
ICI : Imperial Chemical Industries	NSF : N-ethylmaleimide-Sensitive Factor
IGEC : Immortalized Glandular Epithelial Cells	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1	pb : paire de bases
IKK : I κ B kinase	PBS : Phosphate Buffered Saline
INR : élément initiateur de la transcription	PCR : Polymerase Chain Reaction
IPTG : IsoPropyl- β -D-Thio-Galactopyranoside	PE : PhosphatidylEthanolamine
kb : kilobase	PER : PERiod
kDa : kiloDalton	PFA : ParaFormAldéhyde
KOR : Récepteur κ aux Opioides	PI3K : Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
LB : milieu de Luria Bertani	PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride
LC3 : Light Chain 3	PRIP1 : Phospholipase-C Related catalytically Inactive Protein type 1
LDL : Low Density Lipoprotein	PTB : PhosphoTyrosine Binding
LIN : Lobular Intraepithelial Neoplasia	PVDF : PolyVinylidène DiFluoride
LIR : LC3-Interacting Region	PX-RICS : PhoX-RhoGAP Involved in the β -Catenin-N-cadherin and NMDA receptor Signaling
MAP : Microtubule-Associated Protein	RAF : Ras-Activated Factor

RE : Récepteur aux Estrogènes	SSC : Saline Sodium citrate
REV-ERBα : REVerse orientation c-erbA-1 α	SQSTM1 : SeQueSTosoMe 1
RFP : Red Fluorescent Protein	SRC : SaRComa
RNAi : RNA interférence	Stbd1 : Starch binding domain1
RP : Récepteur à la Progestérone	SV40 : Virus Simien 40
RT-PCR : Reverse Transcription-PCR	SVF : Sérum de Veau Foetal
SBR : Scarff, Bloom et Richardson	TBS : Tris Buffered Saline
SDS : Sodium DodécylSulfate	TCEP : Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	TGFα : Transforming Growth Factor α
siRNA : small interfering RNA	Tm : melting Temperature
shRNA : small hairpin RNA	TNM : Tumor Node Metastasis
SNAP : Soluble NSF Adaptator Protein	Tris : Tri-(hydroxyméthyl) amino methane
SNAP-25 : SyNaptosome-Associated Protéin of 25 kDa	UBA : Ubiquitin-Associated Domain
SNARE : SNAP REceptors	UICC : Union Internationale Contre le Cancer
SNC : Système Nerveux Central	ULK1 : Unc-51-Like Kinase 1
SP-1 : Promoter-Specific transcription factor-1	UTR : UnTranslated Region
SPR : Surface Plasmon Resonance	

*CADRE ET BUT
DU TRAVAIL*

Le gène *gec1* (*glandular epithelial cell 1*) ou *gabapapl1* (*gabapap like 1*) de cobaye a été découvert par notre équipe, au début des années 1990, comme étant un gène régulé précocement et positivement par les estrogènes dans des cellules épithéliales glandulaires d'endomètre de cobaye (CEGE) (Pellerin *et al.*, 1993b). Cette découverte s'inscrivait dans le cadre de la thématique du laboratoire qui consistait à identifier de nouveaux gènes estrogéno-dépendants dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action moléculaires des estrogènes. Aucune information, que ce soit au niveau de sa régulation ou de sa fonction n'étant disponible à l'époque, notre équipe n'a réellement pu débiter l'étude de ce gène que quelques années plus tard suite au développement des bases de données. L'organisation du gène ainsi que sa régulation ont ainsi pu être précisées et en particulier chez le cobaye. Une induction de l'expression de *gabapapl1*, sous l'effet des estrogènes, a été confirmée dans différents types cellulaires et une séquence cis-régulatrice ERE (Elément de Réponse aux Estrogènes) a pu être identifiée chez le gène de cobaye (Vernier-Magnin *et al.*, 2005). La découverte de la protéine GABARAP (GABA_A Receptor-Associated Protein) comme étant une protéine favorisant le transport intracellulaire du récepteur GABA_A (Gamma-AminoButyric Acid type A receptor) a aussi permis d'initier la recherche du rôle biologique de la protéine GABARAPL1 (Chen *et al.*, 2000 ; Leil *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 1999). En effet, chez l'homme, les ADNc *gec1* et *gabapap* possèdent 79% d'identité et les protéines correspondantes 87%. Ce gène a ainsi intégré la famille *gabapap*, déjà constituée des gènes *gabapap*, *gabapapl2* (*gabapap like 2*) et *gabapapl3* (*gabapap like 3*), basée sur l'homologie de séquence entre les différents membres (Xin *et al.*, 2001).

Les protéines codées par ces gènes sont toutes composées de 117 acides aminés et présentent des structures tridimensionnelles organisées de manière similaire. Au sein de cette famille, la protéine GABARAPL1 reste la plus proche de celle GABARAP, de par leur forte identité de séquence et de par leur localisation cellulaire. Par conséquent, ces observations ont permis de suggérer que ces deux protéines pourraient accomplir des fonctions cellulaires semblables, en l'occurrence *via* leur interaction avec des partenaires protéiques communs. Notre équipe a ainsi pu démontrer une interaction *in vitro* de GABARAPL1 à la fois avec la tubuline et avec la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A (Mansuy *et al.*, 2004). Une implication de la protéine GABARAPL1 dans le trafic du récepteur GABA_A à la membrane plasmique dans le cerveau a ainsi pu être envisagée. L'identification de nouveaux partenaires protéiques de GABARAPL1 constitue donc un enjeu majeur pour la poursuite de la caractérisation fonctionnelle de cette protéine. Les études concernant l'expression, la localisation ou la

fonction de la protéine GABARAPL1 sont toutefois restées limitées dans la mesure où aucun anticorps ne distinguait spécifiquement GABARAPL1 et GABARAP en immunohistochimie ou en western blotting.

Les études concernant *gabapapll* se sont donc principalement focalisées sur l'ARNm dont l'UTR-3' ne présente pas d'identité avec l'UTR-3' de l'ARNm *gabapap*. Les messagers *gabapapll* et *gabapap* sont exprimés de façon ubiquitaire mais possèdent toutefois des profils d'expression différents. *Gabapapll* est préférentiellement exprimé dans le système nerveux central (SNC) alors que *gabapap* présente une plus forte expression dans les tissus endocrines suggérant des rôles distincts de *gabapapll* et *gabapap* en fonction du tissu considéré (Nemos *et al.*, 2003). Par ailleurs, cette même analyse a également révélé une faible expression de *gabapap* et surtout de *gabapapll* dans les différentes lignées cancéreuses testées. Cette étude a permis, pour la première fois, d'envisager une implication de *gabapapll* dans les cancers.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu pour principaux objectifs :

- de contribuer à la caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 : d'une part, en recherchant de nouveaux partenaires protéiques de GABARAPL1 et en étudiant plus précisément l'interaction de GABARAPL1 avec un de ces partenaires, HSP90 β , et d'autre part, en participant au travail d'autres membres de l'équipe concernant l'étude du rôle de la protéine GABARAPL1 dans le processus d'autophagie.

- d'étudier l'expression de *gabapapll* dans des tissus cancéreux et en particulier dans les cancers du sein puis d'évaluer l'effet de sa surexpression dans une lignée dérivant de cancer du sein humain.

Ces résultats ont fait l'objet de trois publications dont une actuellement en soumission :

D) Alexandre Berthier*, **Stéphanie Seguin***, Annie Sasco, Jean-Yves Bobin, Guy De Laroche, Jean Datchary, Simone Saez, Claire Rodriguez-Lafrasse, Fabrice Tolle, Annick Fraichard, Michaël Boyer-Guittaut, Michèle Jouvenot, Régis Delage-Mourroux and Françoise Descotes. (2010). High expression of *gabapapll* is associated with better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer*, **102**:1024-1031.

* *Contribution égale au travail.*

II) 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 and Régis Delage-Mourroux. Identification of HSP90 α/β as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein.

En soumission dans «Biochimie ».

III) 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. (2010). GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy*, **6** : 1-11.

Par ailleurs, une revue traitant de la régulation, de l'expression et des fonctions reconnues ou potentielles de *gabarapl1* a été récemment acceptée pour publication :

IV) Jaclyn Nicole Le Grand*, Fatima-Zahra Chakrama*, **Stéphanie Seguin-Py***, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut. GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? Sous presse dans « Autophagy » (octobre 2011).

** Contribution égale au travail.*

INTRODUCTION

1 *Gabarapl1* : SA DECOUVERTE, LE GENE, LE MESSAGER ET SA REGULATION

1.1 Découverte et organisation du gène et du messager

Une approche visant à identifier de nouveaux gènes estrogéno-dépendants à partir de CEGE a été développée dans notre laboratoire. Ce modèle d'étude a été validé suite à l'induction de l'expression du gène *c-fos* [FBJ (Finkel, Biskis, and Jinkins) osteosarcoma] par de l'estradiol-17 β (E₂) en association avec le facteur de croissance épidermique (EGF) et de l'insuline (Jouvenot *et al.*, 1990) ou avec de la cycloheximide (Chx) (Pellerin *et al.*, 1992). Le criblage d'une banque d'ADNc extraite de CEGE stimulées 2 h par E₂ en présence de Chx a permis notamment d'isoler un fragment d'ADNc de 833 pb correspondant à la région non traduite UTR-3' d'un gène régulé précocement et positivement par E₂ appelé *gec1* (Pellerin *et al.*, 1993a). L'induction de l'expression du messager *gec1*, d'une taille estimée de 1,8 kb, a été confirmée par northern blotting/hybridation à l'aide d'une sonde ADN complémentaire de l'ARNm *gec1*. La détermination de l'organisation du gène *gec1*, et par conséquent de la séquence totale de l'ADNc *gec1* de cobaye, a été réalisée suite au criblage d'une banque d'ADN génomique de cobaye. L'orthologue *gec1* humain a été identifié par criblage d'une banque d'ADNc d'origine placentaire à l'aide de la sonde produite chez le cobaye (Vernier-Magnin *et al.*, 2001).

Le gène *gec1* humain est localisé sur le chromosome 12 et est constitué de 4 exons et de 3 introns. Le gène *gec1* de cobaye est composé du même nombre d'introns et d'exons. Chez le cobaye, un élément initiateur de la transcription (INR), de séquence CCAGTGC situé 310 pb en amont du codon d'initiation de la traduction ATG lui-même localisé au sein du premier exon, ainsi qu'une boîte TATA située 54 pb en amont de l'INR ont pu être identifiés. Des expériences de transfections transitoires réalisées à l'aide de mutants de délétion de la séquence 5' terminale de 1538 pb en amont de l'ATG ont permis de montrer que l'initiation de la transcription a lieu au niveau de l'INR et non pas au niveau de la boîte TATA jugée non fonctionnelle (Vernier-Magnin *et al.*, 2005) (Figure 1).

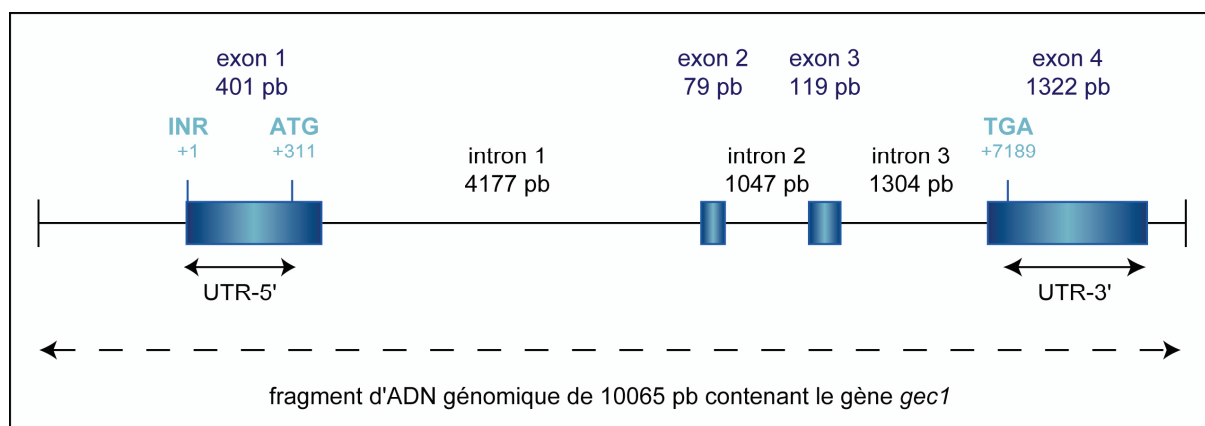


Figure 1 : Organisation du gène *gec1* de cobaye. Les tailles des introns et des exons sont indiquées ainsi que les positions de l'INR (+1), du codon d'initiation de la traduction ATG (311), du codon de terminaison la traduction TGA (7189). Les UTR-5' et -3' sont également représentées. INR: élément initiateur de la transcription ; UTR : UnTranslated Region. D'après Vernier-Magnin et collaborateurs (2001).

Les ADNc *gec1* humain et de cobaye sont constitués de 1959 pb et 1921 pb respectivement. Ils possèdent des séquences codantes de même taille, 351 pb, présentant 93% d'identité entre elles et des séquences UTR-5' et UTR-3' possédant 62,2% et 73,8% d'identité respectivement (Figure 2).

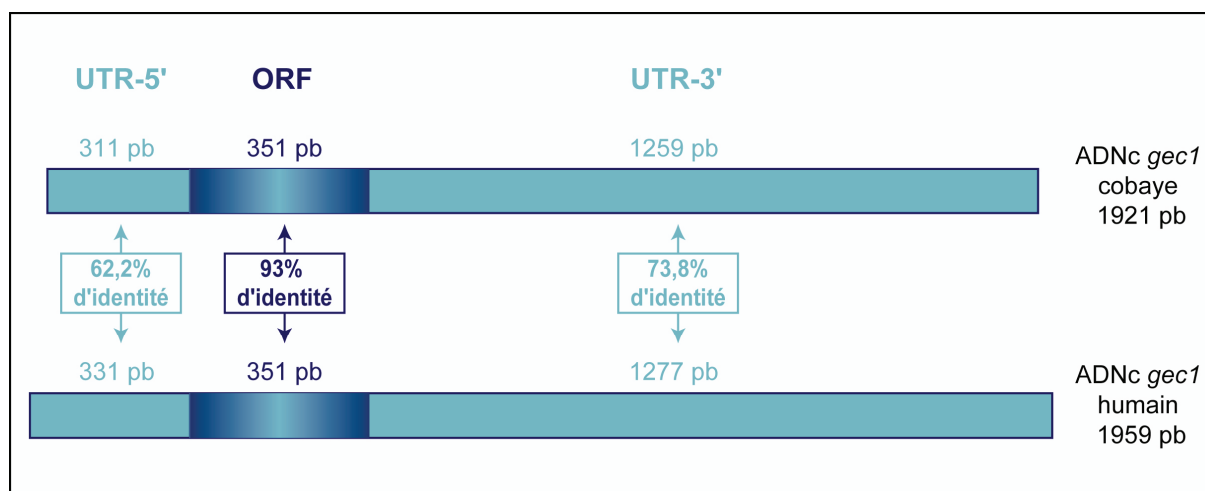


Figure 2 : Comparaison des séquences des ADNc *gec1* humain et de cobaye. ORF : Open Reading Frame ; UTR : UnTranslated Region. Les séquences des ADNc ont été obtenues à partir des bases de données NCBI ou GenBank. Les numéros d'accèsion sont : ADNc *gec1* cobaye (NM_001172950) et ADNc *gec1* humain (AF287012).

Par ailleurs, les parties codantes des ADNc *gec1* humain et de cobaye présentent respectivement 79% et 76,8% d'identité avec la partie codante de l'ADNc *gabarap* humain composé de 924 pb. A ce titre, le gène *gec1* est également appelé *gabarapl1*. En revanche, les

régions non traduites 5' et 3' des ADNc *gabapap11* et *gabapap* ne présentent aucune identité entre elles, ce qui permet de détecter, grâce à des sondes spécifiques, l'expression différentielle des deux gènes (Figure 3).

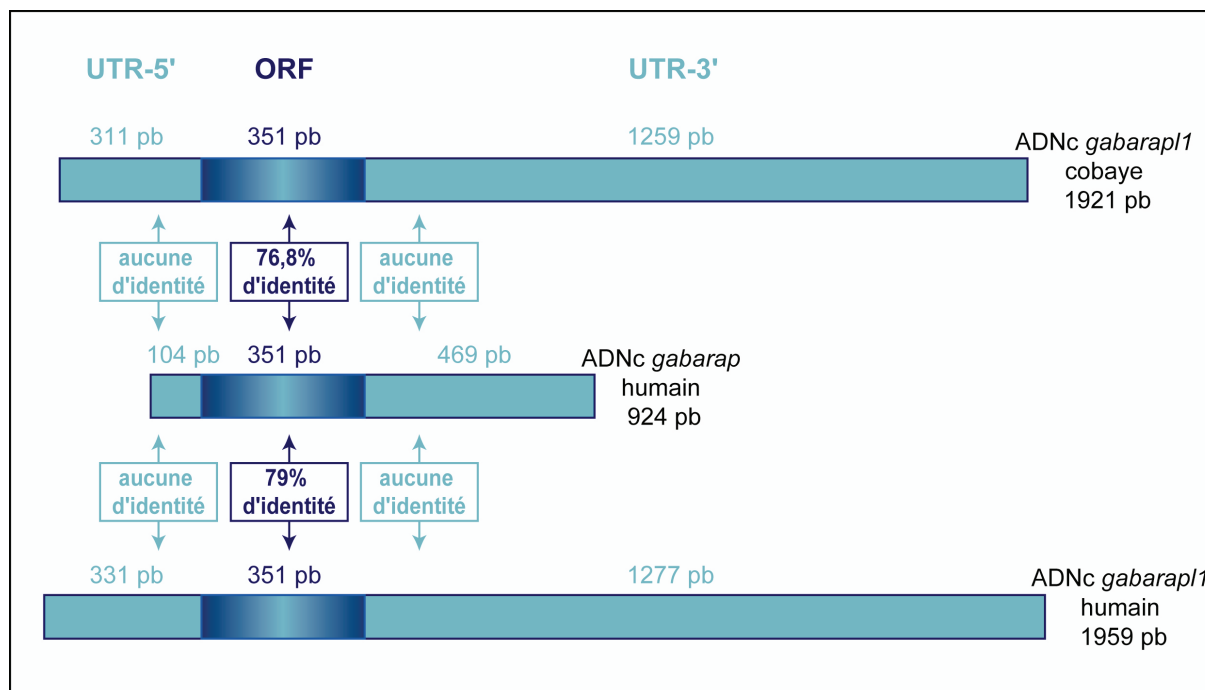


Figure 3 : Comparaison des séquences des ADNc *gabapap11* humain et de cobaye et de l'ADNc *gabapap* humain. ORF : Open Reading Frame ; UTR : UnTranslated Region. Les séquences des ADNc ont été obtenues à partir des bases de données NCBI ou GenBank. Les numéros d'accèsion sont : ADNc *gabapap11* cobaye (NM_001172950), ADNc *gabapap* humain (NM_007278) et ADNc *gabapap11* humain (AF287012). D'après Vernier-Magnin et collaborateurs (2001).

Simultanément à la caractérisation du gène *gabapap11* de cobaye au laboratoire, Xin et collaborateurs ont cloné trois paralogues de l'ADNc *gabapap* humain : *gabapap11*, *gabapap12* et *gabapap13* identifiés comme appartenant à une nouvelle famille de gènes, appelée famille *gabapap*, du fait des fortes identités de séquences partagées par leurs ADNc. *Gabapap13* est en fait un pseudogène, composé d'un seul exon, pouvant tout de même donner naissance à un transcrit dans le cerveau et le foie avec lequel l'ADNc *gabapap11* partage un fort pourcentage d'identité (Xin *et al.*, 2001). Plus tard, les protéines codées par ces gènes ont pu être étudiées, permettant en réalité de définir la famille des gènes *gabapap* comme une sous-famille de la famille des gènes *atg* (*autophagy-related*) 8, la protéine de levure Atg8 jouant un rôle dans le processus d'autophagie. Les protéines codées par les gènes de la sous-famille *gabapap* sont principalement connues pour être impliquées dans le trafic intracellulaire de protéines. La seconde sous-famille est composée, chez l'homme, des gènes *light chain 3a* (*lc3a*), *light*

chain 3b (lc3b) et *light chain 3c (lc3c)* dont les protéines correspondantes sont largement caractérisées dans le processus d'autophagie. Les gènes humains sont localisés sur des chromosomes différents, chromosomes 12, 17, 16, 15, 20, 16, et 1 pour *gabapap11*, *gabapap*, *gabapap12*, *gabapap13*, *lc3a*, *lc3b* et *lc3c* respectivement (Le Grand *et al.*, 2011).

1.2 Expression du messager *gabapap11*

1.2.1 Expression dans les tissus

Plusieurs études visant à rechercher l'expression de l'ARNm *gabapap11* dans des tissus de différentes origines ont permis de montrer une expression ubiquitaire de ce messager, par utilisation de sondes spécifiques, chez le cobaye, la souris et l'homme. Toutefois, des expériences de northern blotting/hybridation ont révélé une expression de l'ARNm de cobaye plus élevée dans le foie, l'endomètre et les poumons (Vernier-Magnin *et al.*, 2001) alors que l'ARNm de souris est plutôt exprimé dans le cerveau et le rein (Xin *et al.*, 2001). Chez l'homme, des expériences complémentaires de northern blotting/hybridation et de macro-array ont révélé de forts taux d'expression de l'ARNm *gabapap11* dans le cerveau, le cœur, le foie, les ovaires, la rate, les leucocytes de sang périphériques, les reins, le placenta et le muscle squelettique. Les tissus endocrines tels que le thymus ou le pancréas, les tissus fœtaux et les organes du système digestif présentent les taux d'expression les plus faibles (Kusama *et al.*, 2009 ; Nemos *et al.*, 2003 ; Xin *et al.*, 2001). Ces trois études ont été réalisées comparativement aux taux d'expression du messager *gabapap* dans les mêmes tissus. L'ARNm *gabapap* est présent dans tous les tissus testés avec peu de variations d'expression mis à part dans les tissus endocrines tels que les testicules, les ovaires ou la glande thyroïde où l'expression est la plus élevée, à l'inverse de *gabapap11* (Nemos *et al.*, 2003).

La membrane utilisée pour l'étude de macro-array était composée pour majeure partie d'ADNc provenant de multiples aires de cerveau humain. Le messager *gabapap11* a été détecté dans toutes les parties du cerveau avec une expression particulièrement importante dans le cortex, le pons, le putamen et le lobe temporal. L'ARNm *gabapap* était lui aussi exprimé dans ces mêmes aires mais avec des taux moins élevés (Nemos *et al.*, 2003).

1.2.2 Expression dans le cerveau

Une investigation plus précise de l'expression de *gabapap11* dans le cerveau a été réalisée par la suite. Des expériences de RT-PCR quantitative, précédées d'une microdissection cérébrale, ont été effectuées à l'aide d'amorces spécifiques s'hybridant au niveau de l'UTR-3'

de l'ADNc *gabrapl1* à partir de différentes régions de cerveaux de rats mâles (bulbe olfactif, cortex, hippocampe, l'ensemble des noyaux cérébraux, diencéphale, cervelet, tronc, hypophyse). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus suite à l'amplification de séquences correspondant aux UTR-3' des ADNc *gabrap*, *gabrapl2* et *lc3b* de rat. Après *gabrap*, les parties codantes des ADNc *gabrapl2* et *lc3b* présentent les pourcentages d'identité les plus importants avec *gabrapl1* (74,9%, 64% et 51% d'identité avec *gabrap*, *gabrapl2* et *lc3b* respectivement). Cette étude a permis de révéler que *gabrapl1* est majoritairement exprimé dans le tronc et le diencéphale. De plus, parmi les quatre gènes étudiés, *gabrapl1* est celui le plus exprimé dans les différentes régions cérébrales testées, suivi par *lc3b*, *gabrap* et *gabrapl2* (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006b) (Figure 4).

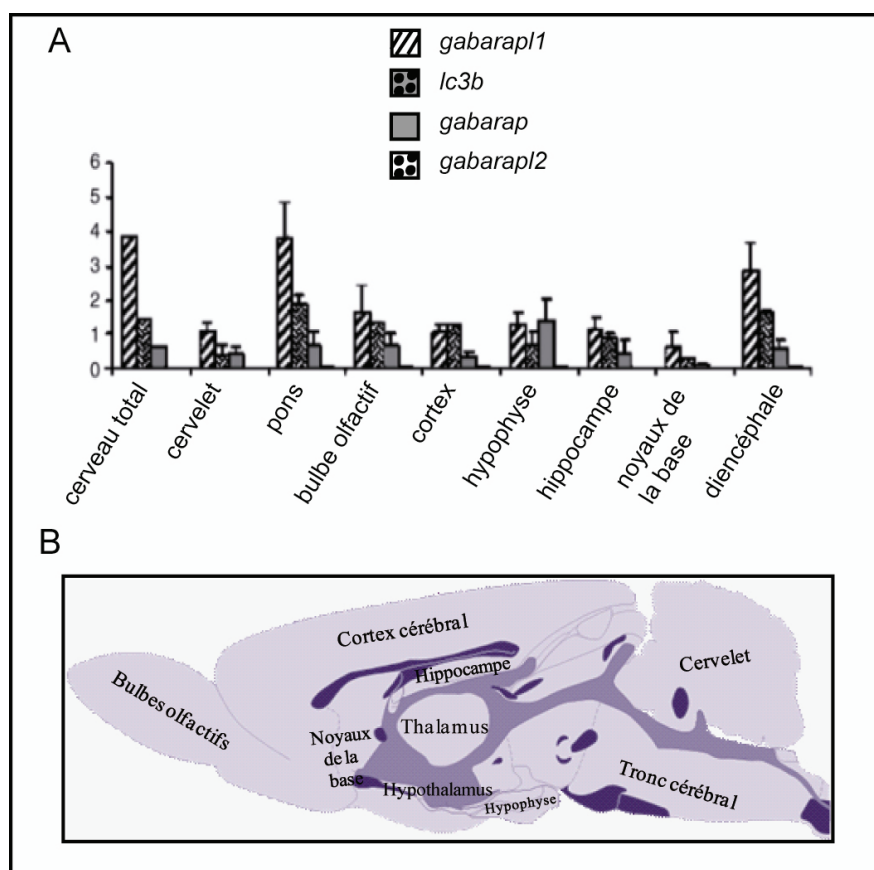


Figure 4 : A. Profil d'expression des ARNm *gabrapl1*, *lc3b*, *gabrap* et *gabrapl2* dans différentes aires de cerveau de rat par RT-PCR quantitative. Les résultats ont été normalisés par le gène γ -actine. Les valeurs sont exprimées par rapport au taux d'ARNm *gabrapl1* dans le cervelet. Modifié d'après Tolle et collaborateurs (2008). **B. Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rat.** Les tissus, les ventricules et les faisceaux de fibres sont représentés en gradient de violet du plus clair au plus foncé.

Ce profil d'expression de *gabap11* dans le système nerveux central, depuis les bulbes olfactifs jusqu'au cervelet et la moelle épinière, a été confirmé par des expériences d'hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde ARN anti-sens spécifique d'une partie de l'UTR-3' (Tolle *et al.*, 2008). Cette cartographie d'expression de *gabap11* a surtout permis de localiser exclusivement le messager dans les neurones et spécialement dans les neurones impliqués dans les fonctions motrices et neuroendocrines. La répartition des neurones exprimant *gabap11* n'est donc pas homogène selon la région du cerveau considéré.

Plusieurs études ont montré que le messager *gabap11* était fortement exprimé dans des neurones à fonction neuroendocrine localisés dans l'aire préoptique de l'hypothalamus, les neurones à GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormon) (Malyala *et al.*, 2005 ; Malyala *et al.*, 2004) et dans la lignée cellulaire GnV-3, un modèle de neurones à GnRH immortalisés de manière conditionnelle (Mansuy *et al.*, 2009). Dans ces cellules, l'expression de l'oncogène *v-myc* (*myelocytomatosis viral oncogene*), sous le contrôle d'un système Tet-On (Tetracycline-regulated gene expression system), n'est permise qu'en présence de doxycycline, un dérivé de la tétracycline (Salvi *et al.*, 2006). Les cellules pourront donc être soit dans un état différencié soit dans un état prolifératif, en fonction de l'expression de *v-myc*. La GnRH est une hormone responsable de la synthèse et de la sécrétion de deux autres hormones, l'hormone folliculostimulante et l'hormone lutéinisante, par l'anté-hypophyse, impliquées dans les fonctions reproductrices. Plus récemment, l'équipe du Pr. François Pralong, à Lausanne, a montré une augmentation de l'expression de *gabap11* par RT-PCR quantitative et analyse en micro-array dans les cellules GnV-3 différenciées par rapport à des cellules GnV-3 en état prolifératif (Mansuy *et al.*, 2011). La signification biologique de cette induction reste encore à déterminer.

Enfin, une analyse en micro-array suivie d'une confirmation par RT-PCR quantitative a montré une surexpression de *gabap11* dans des cellules mononucléaires de sang périphérique chez des patients atteints du syndrome de fatigue chronique (Kaushik *et al.*, 2005).

1.2.3 Expression de *gabap11* dans les pathologies : cancers et maladies neurodégénératives

- **Expression de *gabap11* dans les cancers**

Dans notre laboratoire, la faible expression, voire la perte d'expression, du messager *gabap11* a été démontrée pour la première fois dans des lignées cancéreuses en comparaison avec des tissus normaux par analyse en macro-array (Nemos *et al.*, 2003). L'expression du

messager *gabapap*, également évaluée, diminue mais cette diminution est moins importante que celle constatée pour *gabapap11*.

D'autres données suggèrent une implication du messager *gabapap* et de la protéine GABARAP dans les cancers. Une perte d'expression du gène et de la protéine GABARAP a été également observée dans la lignée cellulaire de cancer du sein CAL51. La surexpression de GABARAP dans ces cellules est corrélée *in vitro* à une diminution de la prolifération et à une capacité réduite à former des colonies sur agar mou et, *in vivo*, à une suppression de la tumorigénicité chez des souris immuno-déficientes suite à l'injection de ces cellules (Klebig *et al.*, 2005). *Gabapap* agirait comme un gène suppresseur de tumeur dans ce type cellulaire mais le mécanisme moléculaire mis en jeu n'a pas été élucidé. Cette constatation ne peut cependant pas être généralisée à tous les types de cancer. En effet, alors que Roberts et collaborateurs ont montré que l'expression de *gabapap* est un facteur de bon pronostic pour les patients présentant un neuroblastome (Roberts *et al.*, 2004), Miao et collaborateurs associent la forte expression de la protéine GABARAP à une réduction de la vie des patients atteints de carcinomes colorectaux (Miao *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'expression de GABARAP et du récepteur GABA_A est considérablement augmentée dans les adénomes et les cancers de la thyroïde (Roberts *et al.*, 2009).

Etant donné la forte homologie de *gabapap11* et *gabapap*, l'ensemble de ces données est donc en faveur d'un rôle de *gabapap11* dans l'oncogenèse et/ou la progression tumorale. Afin de mieux comprendre le rôle joué par *gabapap11*, l'expression de ce gène a été étudiée cette fois-ci directement dans des tumeurs du SNC, les méningiomes, collectés auprès du CHU de Besançon. Un méningiome est une tumeur souvent bénigne (grades I et II) mais parfois maligne (grade III), à croissance lente, qui se développe à partir de cellules méningothéliales de l'arachnoïde du revêtement méningé de l'encéphale et de la moelle épinière au voisinage des voies de drainage veineux. Les méningiomes représentent environ 20% des tumeurs intracrâniennes (Kleihues *et al.*, 2002) et sont deux fois plus fréquents chez la femme que chez l'homme suggérant une implication hormonale dans leur développement. Les méningiomes cancéreux de haut grade présentent une forte expression des récepteurs aux estrogènes alors que les récepteurs à la progestérone sont faiblement exprimés. Un lien entre méningiomes et cancer du sein a également pu être établi. En effet, une augmentation du risque de développer un méningiome est plus élevé chez les femmes ayant déjà eu un cancer du sein et inversement (Custer *et al.*, 2002). Ainsi, l'estrogéno-dépendance de *gabapap11* et

son expression préférentielle dans le SNC suggère une fonction particulière de ce gène, à la différence de ses homologues, dans les tumeurs du SNC.

L'expression de l'ARNm *gabarapl1* a été étudiée, par RT-PCR quantitative, dans une cinquantaine de méningiomes de grade I n'exprimant pas le récepteur aux estrogènes, en comparaison avec trois méninges saines. Les tumeurs bénignes de grade I sont classées en quatre catégories selon leurs caractéristiques histologiques : fibromateux, transitionnel, méningothélial et psammomateux. Des variations d'expression ont été constatées dans les différents méningiomes selon le type de méningiomes, le sexe des patients et l'âge de survenue chez les femmes. Le taux le plus faible de *gabarapl1* a été observé dans les méningiomes psammomateux. Le taux de messagers est plus élevé chez les femmes dans les méningiomes transitionnels et méningothéliaux et plus élevé chez les hommes dans les psammomateux. Enfin, une chute du taux d'ARNm est observée avec l'âge croissant des patientes, coïncidant avec la moyenne d'âge européenne de survenue de la ménopause (Tolle, 2008).

- **Expression de *gabarapl1* dans les maladies neurodégénératives**

La neurodégénérescence correspond à la perte progressive de la structure ou de la fonction de neurones, voire à la mort des neurones, pouvant entraîner des maladies neurodégénératives telles que Parkinson, Alzheimer et Huntington.

Plusieurs données sont en faveur d'un rôle de *gabarapl1* dans le phénomène de neurodégénérescence. Le messenger *gabarapl1* est fortement exprimé dans la *substantia nigra pars compacta*, région du cerveau constituée principalement de neurones dopaminergiques impliqués dans la maladie de Parkinson alors que son expression est manquante dans la *substantia nigra pars reticula* (Tolle *et al.*, 2008). De plus, deux études en micro-array ont montré que l'expression de *gabarapl1* est fortement réduite dans la *substantia nigra pars compacta* chez des patients atteints de la maladie de Parkinson ainsi que dans le cortex préfrontal de macaques traités au MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-TetrahydroPyridine), neurotoxine qui provoque les symptômes permanents de la maladie de Parkinson en détruisant les neurones dopaminergiques de la *substantia nigra* (Simunovic *et al.*, 2010 ; Storvik *et al.*, 2010). En revanche, l'expression de *gabarap* et de *lc3* n'est pas modifiée, suite aux traitements, chez ces macaques. Par ailleurs, la protéine GABARAPL1 interagit avec la protéine α -synucléine (§ 2.3), jouant un rôle crucial dans des synucléinopathies comme la

maladie de Parkinson ou la démence à corps de Lewy se caractérisant par une accumulation d'agrégats d' α -synucléine dans les corps de Lewy (Schnack *et al.*, 2008).

1.3 Régulation

1.3.1 Régulation par les estrogènes

Les estrogènes, en particulier l'estradiol-17 β , jouent un rôle majeur au niveau du système reproducteur, du système osseux, du système cardio-vasculaire et des glandes mammaires. Les estrogènes sont également liés au développement et à la progression de cancers, spécialement les cancers du sein, de l'utérus et de la prostate (Bonkhoff and Berges, 2009 ; Carruba, 2006 ; Deroo and Korach, 2006 ; Henderson and Feigelson, 2000 ; Henderson *et al.*, 1982).

Des récepteurs spécifiques répartis en deux catégories, les récepteurs nucléaires et les récepteurs membranaires, sont responsables de ces différents effets physiologiques. Il existe deux types de récepteurs aux estrogènes (RE) nucléaires: RE α et RE β produits par deux gènes distincts et présentant un profil d'expression tissulaire différent. Ces récepteurs RE α et RE β sont présents sous chaque forme dans la plupart des organes mais l'isoforme α est principalement exprimée par la glande mammaire et l'utérus alors que la prostate, le testicule et l'ovaire expriment en majorité l'isoforme β . La fonction de ces deux récepteurs est de moduler l'expression de gènes cibles en présence d'estrogènes. Les RE jouent donc le rôle de facteurs de transcription (O'Malley, 2005 ; Zhao *et al.*, 2010).

Plusieurs mécanismes moléculaires d'action des RE nucléaires coexistent au sein de la cellule. En effet, suite à une stimulation estrogénique, les estrogènes peuvent activer la transcription de leurs gènes cibles par différentes voies de signalisation. La majorité de ces voies sont dépendantes du ligand et englobent des mécanismes d'action génomiques directs et indirects ou extra-génomiques (Cato *et al.*, 2002 ; Klinge, 2001 ; Levin, 2009 ; Vasudevan and Pfaff, 2008). En absence de ligand, les RE non activés sont localisés dans le cytoplasme ou le noyau sous forme de dimères libres ou de monomères au sein de complexes protéiques composés de protéines chaperons de type HSP (Heat Shock Protein), principalement HSP90, HSP70 et HSP60 et de la protéine co-chaperon p23 (Pratt and Toft, 1997). Il existe également des voies de signalisation dites indépendantes du ligand où les RE peuvent être activés par phosphorylations suite à la stimulation par différents facteurs de croissance tels que l'EGF ou l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1) mimant les effets biologiques de E₂ (Flint *et al.*, 2002).

Concernant le mécanisme d'action génomique des estrogènes, la transcription des gènes cibles est assurée, soit par la fixation directe du RE activé sous forme de dimère sur une séquence ADN cis-régulatrice spécifique soit, par la fixation de ce dimère à d'autres facteurs de transcription eux-mêmes liés à leur séquence ADN cible. Dans le cas d'une interaction directe, la séquence ADN cis-régulatrice spécifique à laquelle le dimère se lie est appelée ERE (Elément de Réponse aux Estrogènes). La séquence ERE présentant la plus forte affinité pour le récepteur a été identifiée comme étant: 5'AGGTCAnnnTGACCT3' (Klein-Hitpass *et al.*, 1986). Les RE α et RE β , après fixation du ligand, forment des homodimères ou des hétérodimères et se lient ensuite avec une forte affinité sur la séquence ERE (Hyder *et al.*, 1999). Cependant, de nombreux gènes estrogène-dépendants possèdent des motifs de reconnaissance s'écartant de cette séquence consensus, appelés ERE imparfaits et présentant une affinité moindre pour le récepteur (Loven *et al.*, 2001). L'activité régulatrice du récepteur aux estrogènes est le plus souvent sous le contrôle de protéines nucléaires appelées corégulateurs (coactivateurs et corépresseurs). Les coactivateurs agissent en complexes multiprotéiques et possèdent une activité histone acétyltransférase et permettent ainsi le remodelage de la chromatine puis de l'initiation de la transcription (Figure 5).

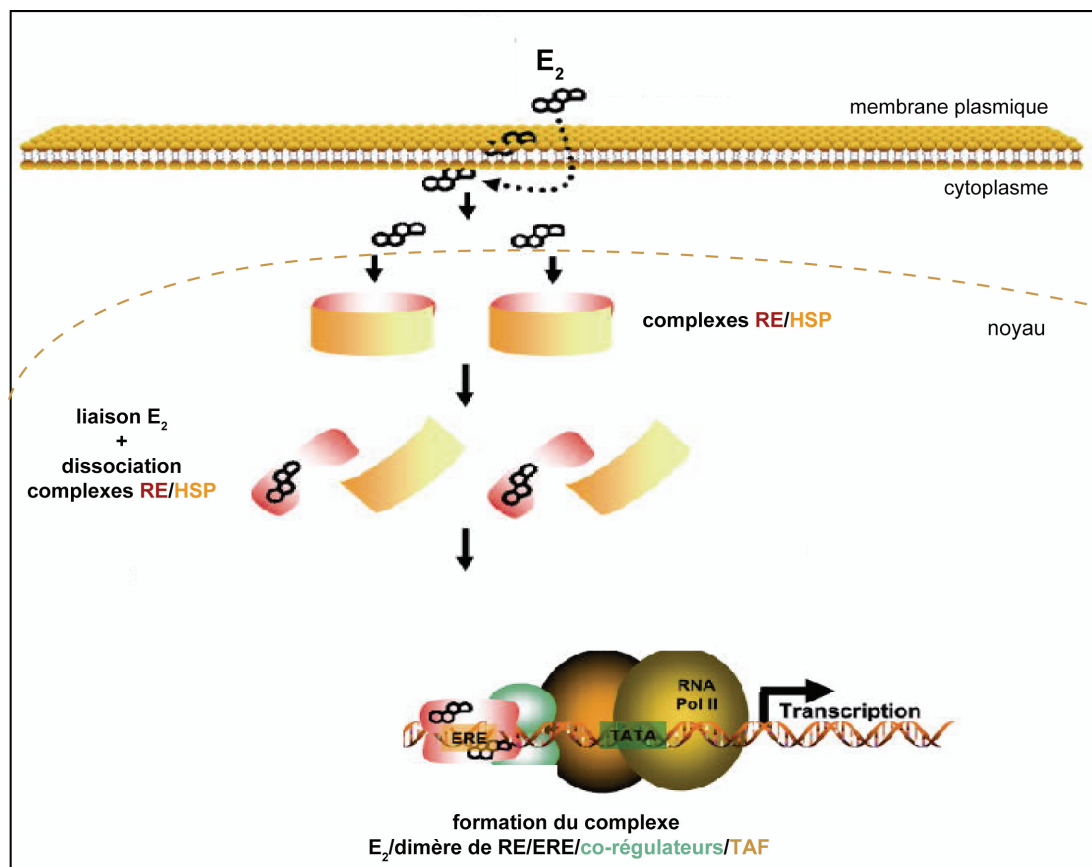


Figure 5 : Mécanisme général de l'action des récepteurs nucléaires aux estrogènes humains. HSP : Heat Shock Protein ; RE : récepteur aux estrogènes ; RNA Pol II : ARN polymérase II, TAF : TATA binding protein Associated Factors. Modifié d'après Belcher et collaborateurs (2008).

Les RE sont également capables de moduler l'expression de gènes qui ne possèdent pas de séquence ERE dans leur région promotrice mais d'autres séquences cis-régulatrices capables de fixer les facteurs de transcription qui leur sont spécifiques tels que le site SP-1 (Promoter-Specific transcription factor-1) ou boîte GC fixant la protéine SP-1, le site AP-1 (Activator Protein-1) fixant des dimères JUN/JUN ou FOS/JUN ou encore le site CRE (Cyclic AMP Response Element) fixant les facteurs de transcription de la famille CREB (CRE Binding protein)/CREM (CRE Modulator)/ATF (Activating Transcription Factor) (Gaub *et al.*, 1990 ; O'Lone *et al.*, 2004 ; Sabbah *et al.*, 1999). Les RE activés par liaison de l'hormone peuvent interagir directement sous forme de dimères avec ces facteurs de transcription pour initier la transcription des gènes cibles.

Une classification des gènes régulés par les estrogènes a été établie en fonction du temps écoulé entre la stimulation estrogénique et l'apparition des messagers ou des protéines cibles (Dean and Sanders, 1996 ; Rories and Spelsberg, 1989). Il existe, de par cette classification, trois catégories de gènes régulés. Des gènes précoces (early genes ou primary response

genes), sont régulés rapidement après stimulation hormonale, dans les 30 min qui suivent cette stimulation. L'expression de ces gènes est directement activée par la fixation d'un RE activé sur sa séquence cible ERE et ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo*. Les protéines codées par ces gènes sont des facteurs de transcription (FOS, JUN, MYC), des facteurs de croissance [Estrogen responsive Finger Protein], des cytokines [Transforming Growth Factor α (TGF α)], des facteurs neuroendocrines (prolactine, ocytocine), des enzymes (créatine kinase B, cathepsine D) ou des protéines anti-apoptotiques [B Cell Lymphoma-2 (BCL-2)]. Cette première phase d'expression est suivie de l'induction de gènes précoces retardés (delayed primary response genes) et de gènes tardifs (late genes ou secondary response genes) dans les heures, voire les jours, après stimulation estrogénique. L'expression de ces gènes requiert la présence de facteurs de transcription produits à partir des gènes précoces. Les gènes tardifs, essentiellement des gènes codant des protéines de structure, sont activés exclusivement par fixation de ces facteurs au niveau de leur séquence régulatrice cible. L'expression des gènes précocement retardés est induite par la liaison du RE activé sur une séquence ERE ainsi que par la fixation d'un facteur de transcription de phase précoce sur sa séquence cible (Figure 6).

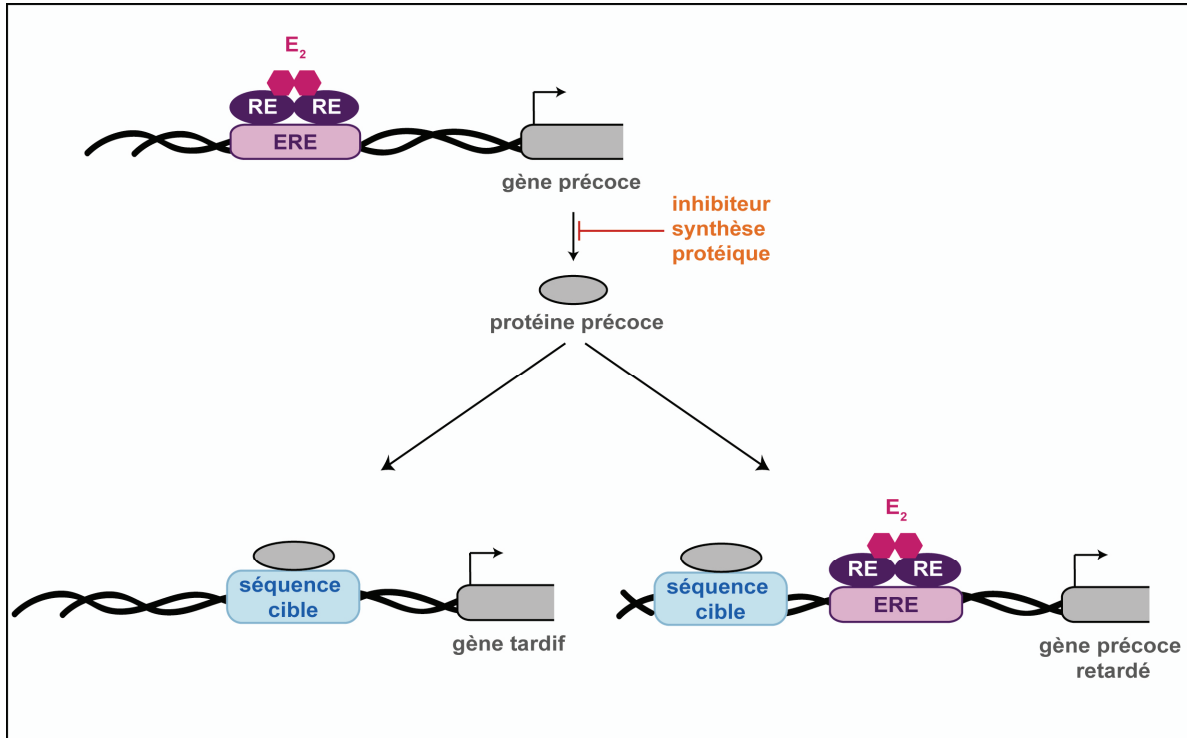


Figure 6 : Activation de la transcription des gènes précoces, précoces retardés, et tardifs par les estrogènes. E_2 : estradiol-17 β ; RE : Récepteur aux Estrogènes ; ERE : Elément de Réponse aux Estrogènes.

Par conséquent, les produits des gènes cibles des RE sont nombreux et de nature variée : récepteurs, ligands, hormones, facteurs de transcription, enzymes, protéines G, protéines de structure. Ces protéines sont ainsi impliquées dans divers processus cellulaires tels que la signalisation, la division, la survie, la croissance et le maintien de l'intégrité cellulaire (O'Lone *et al.*, 2004) (Tableau I).

		FONCTIONS						
		Cycle cellulaire	Croissance-survie	Maintien cellulaire	Signalisation			
					membranaire	intracellulaire	extracellulaire	
NATURES	Récepteurs		RE α récepteur à l'EGF RAGE		RAGE récepteur à l'EGF récepteur aux LDL sous unité 2D du récepteur NMDA	RE α RP RAR		
	Ligands		TGF α VEGF C3				oxytocine TGF α VEGF C3	
	Hormones		IGF-1 lipocaline 2	IGF-1				angiotensine oxytocine IGF-1 lipocaline 2
	Protéine G		c-H-RAS			c-H-RAS		
	Facteurs de transcription		RE α c-FOS			RE α RP RAR c-FOS		
	Enzymes	thymidylate synthase adénosine déaminase	facteur Hageman	TERT cathépsine D				
	Protéines de structures			kératine 19				
	Autres	EBAG9 cycline D1	prothymosine α lactoferrine BCL-2	HSP 27 TFF-1				TFF-1

Tableau I : Natures et fonctions de protéines humaines produites par des gènes régulés par les récepteurs aux estrogènes. BCL-2: B-Cell Lymphoma 2 ; C3 : Complement component 3 ; c-FOS : FBJ (Finkel, Biskis, and Jinkins) OsteoSarcoma ; c-H-RAS : c-Harvey RA Sarcoma ; EBAG9 : Estrogen receptor-Binding fragment-associated AntiGen 9 ; EGF : Epidermal Growth Factor ; HSP27 : Heat Shock Protein 27 ; IGF-1 : Insulin-Like Growth Factor-1 ; LDL : Low Density Lipoprotein ; NMDA : N-Methyl-D-Aspartate ; RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts ; RAR : Retinoic Acid Receptor ; RE α : Récepteur aux Estrogènes α ; RP : Récepteur à la Progestérone ; TERT : Telomerase Reverse Transcriptase ; TFF-1 : TreFoil Factor-1 ; TGF α : Transforming Growth Factor α ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor. D'après O'lonne et collaborateurs (2004).

Le gène *gabarapl1* a été découvert suite à la recherche de nouveaux gènes régulés par les estrogènes dans les CEGE de cobaye. Une lignée de cellules immortalisées appelée IGEC (Immortalized Glandular Epithelial Cells) a été créée, à partir des CEGE, puis caractérisée au laboratoire (Nemos *et al.*, 2004). Une induction précoce de l'expression de *gabarapl1*, d'un facteur 2,3 après 210 min de stimulation, a été rapportée dans les IGEC suite à une

stimulation par E₂ en combinaison avec Chx. Le traitement des cellules par Chx est requis pour pouvoir observer l'effet du traitement par E₂ sur l'expression de *gabrapll*. Un antagoniste du récepteur aux estrogènes, l'ICI 182,780 combiné à E₂ et Chx conduit à l'abolition de l'induction de *gabrapll* par E₂.

Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules issues d'un phéochromocytome de rat exprimant de manière stable ER α (PC12-ER α) différenciées en cellules à phénotype neuronal par traitement au NGF (Nerve Growth Factor) suggérant un rôle de *gabrapll* dans de nombreux tissus estrogéno-dépendants (Tolle, 2008).

L'effet de E₂ a été recherché *in vivo* à partir de rates ovariectomisées. Après 24 h de stimulation par les estrogènes ou le véhicule seul, le taux du messenger *gabrapll* a été évalué dans différentes aires cérébrales. Une augmentation significative de l'expression du messenger par E₂ a été mise en évidence dans le cervelet, le tronc et le diencéphale (Tolle, 2008). Par ailleurs, Malyala et collaborateurs ont démontré par hybridation soustractive et analyse en micro-array une induction de *gabrapll* dans l'hypothalamus de cobaye après 24 h de traitement par E₂ (Malyala *et al.*, 2004).

Afin de déterminer les séquences cis-régulatrices responsables de l'induction de l'expression de *gabrapll* par E₂, des expériences de co-transfection transitoire utilisant d'une part, des séquences délétées de différentes parties de la séquence initiale de 1538 pb en amont de l'ATG du gène de cobaye et d'autre part, des plasmides d'expression de RE α et RE β ont été effectuées dans des cellules CHO (cellules d'adénocarcinome d'ovaire de hamster chinois). Ces expériences ont permis l'identification d'un ERE fonctionnel au niveau du premier exon du gène, en position +36/+50, comme étant responsable de l'induction de *gabrapll* par E₂ *via* RE α uniquement (Vernier-Magnin *et al.*, 2005). L'analyse *in silico* (programmes Tess, Cister, Matinspector) des séquences cis-régulatrices de *gabrapll* humain et de cobaye a permis d'identifier, chez l'humain, un ERE en position +243 ainsi que, chez les deux espèces, des sites AP-1 et/ou SP-1 et/ou CRE (Figure 7).

Parmi les gènes de la famille Atg8, dans la région équivalente à celle étudiée pour *gabrapll* de cobaye, aucun ne possède des séquences cis-régulatrices cibles des estrogènes et par conséquent seule l'expression de *gabrapll* semble inductible directement par les estrogènes.

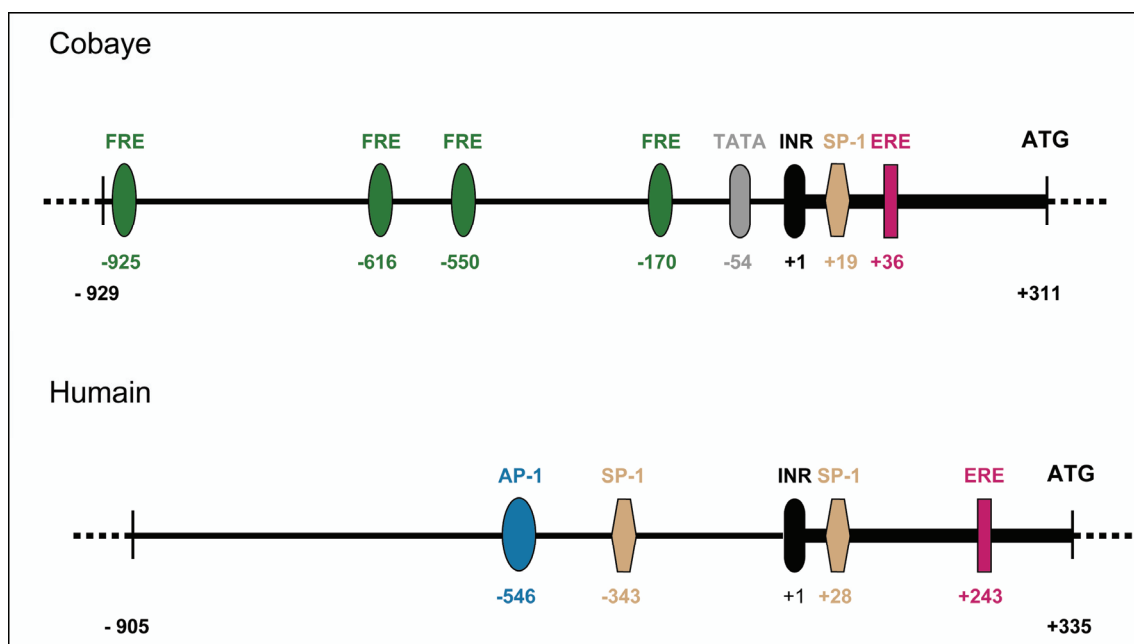


Figure 7 : Représentation des fragments d'ADN génomique de 1240 pb en amont du codon d'initiation de la traduction ATG des gènes *gabarapl1* humain et de cobaye. Les séquences cis-régulatrices sont indiquées. AP-1 : Activator Protein-1 ; ERE : Elément de Réponse aux Estrogènes ; FRE: FoxO-Recognized Element ; INR : élément initiateur de la transcription ; Sp-1 : Promoter-Specific transcription factor-1. D'après Le Grand et collaborateurs (2011).

1.3.2 Régulation par les facteurs de transcription de la famille FoxO

Les protéines FoxO (Forkhead box transcription factors of the O class) appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription de type Forkhead constituée de plus d'une centaine de membres (Kaestner *et al.*, 2000). Ces facteurs de transcription contiennent tous un domaine de liaison à l'ADN d'une centaine d'acides aminés appelé « Forkhead domain » (Clark *et al.*, 1993). Chez les mammifères, quatre protéines FoxO existent : FoxO1/FKHR (ForKHead-Related transcription factor), FoxO3/FKHRL1 (ForKHead-ReLated transcription factor 1), FoxO4/AFX et FoxO6, présentant toutes une forte homologie de séquence entre elles et homologues de la protéine DAF-16 (abnormal DAuer Formation) du nématode *Caenorhabditis elegans*. Elles sont exprimées de manière ubiquitaire (Salih and Brunet, 2008) et sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires tels que l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la longévité, le stress oxydatif, la croissance musculaire, la différenciation cellulaire ou le métabolisme du glucose (Accili and Arden, 2004 ; Barthel *et al.*, 2005 ; Greer and Brunet, 2005). Ces facteurs de transcription sont capables de réguler l'expression de gènes par liaison, sous forme de monomères, à un site spécifique appelé FRE (FoxO-Recognized Element) de séquence consensus

(C/G)(A/T)AAA(C/A)A (Biggs *et al.*, 1999 ; Furuyama *et al.*, 2000 ; Gilley *et al.*, 2003). Cette séquence spécifique est présente au voisinage de nombreux gènes cibles codant par exemple les protéines FasL (Fas Ligand), IGFBP1 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1), BIM (BCL-2 Interacting Mediator of cell death), GADD45 α (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45 α), p27 ou MnSOD (Manganèse SuperOxyde Dismutase) (Accili and Arden, 2004 ; Greer and Brunet, 2005 ; Salih and Brunet, 2008).

En réponse à différents stimuli, les facteurs de transcription FoxO sont finement régulés par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation/déphosphorylation de résidus spécifiques par de multiples kinases [AKT (AKR T cell lymphoma) ou protéine kinase B, p38, ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), AMPK (AMP-activated Protein Kinase), IKK (I κ B kinase), SGK (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinases), MST1 (Mammalian Ste20-like Kinase 1), JNK (JUN-N-terminal Kinase)], l'acétylation/désacétylation par les protéines CBP (CREB Binding Protein), p300 et Sirt1 (Sirtuin 1) ou l'ubiquitinylation (Asada *et al.*, 2007 ; Greer *et al.*, 2007b ; Huang and Tindall, 2007 ; Yang *et al.*, 2008). Selon le type de stimulus, différentes kinases sont mises en jeu, aboutissant soit à l'activation soit à l'inhibition des facteurs de transcription FoxO. En présence d'insuline ou de facteurs de croissance comme l'IGF-1, les protéines FoxO deviennent une des cibles de la voie de signalisation PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)/AKT et sont ainsi phosphorylées par la sérine/thréonine kinase AKT au niveau de trois résidus spécifiques conservés, un résidu thréonine et deux résidus sérine (Thr³², Ser²⁵³ et Ser³¹⁵ pour FoxO3 ; Thr²⁴, Ser²⁵⁶ et Ser³¹⁹ pour FoxO1) (Biggs *et al.*, 1999 ; Brunet *et al.*, 1999 ; Fukunaga *et al.*, 2005 ; Kops *et al.*, 1999 ; Rena *et al.*, 1999). Les protéines FoxO se lient alors, dans le noyau, à la protéine chaperon 14-3-3, ce qui provoque leur exclusion nucléaire, leur séquestration dans le cytoplasme puis leur dégradation par le protéasome. Les protéines FoxO ne peuvent donc plus assurer l'induction de la transcription de leurs gènes cibles essentiellement impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, conduisant ainsi à la survie ou la prolifération des cellules (Brunet *et al.*, 1999). En l'absence de stimulation par des facteurs de croissance ou dans des conditions de stress (stress oxydatif, privation alimentaire), les facteurs de transcription FoxO restent dans le noyau pour activer l'expression de leurs gènes cibles. Il a été montré que l'AMPK pouvait phosphoryler les protéines FoxO au niveau de six résidus spécifiques (Thr¹⁷⁹, Ser³⁹⁹, Ser⁴¹³, Ser⁵⁵⁵, Ser⁵⁸⁸, Ser⁶²⁶ pour FoxO3) dans le noyau des cellules et ainsi entraîner leur activation (Greer *et al.*, 2007a ; Greer *et al.*, 2007b) (Figure 8).

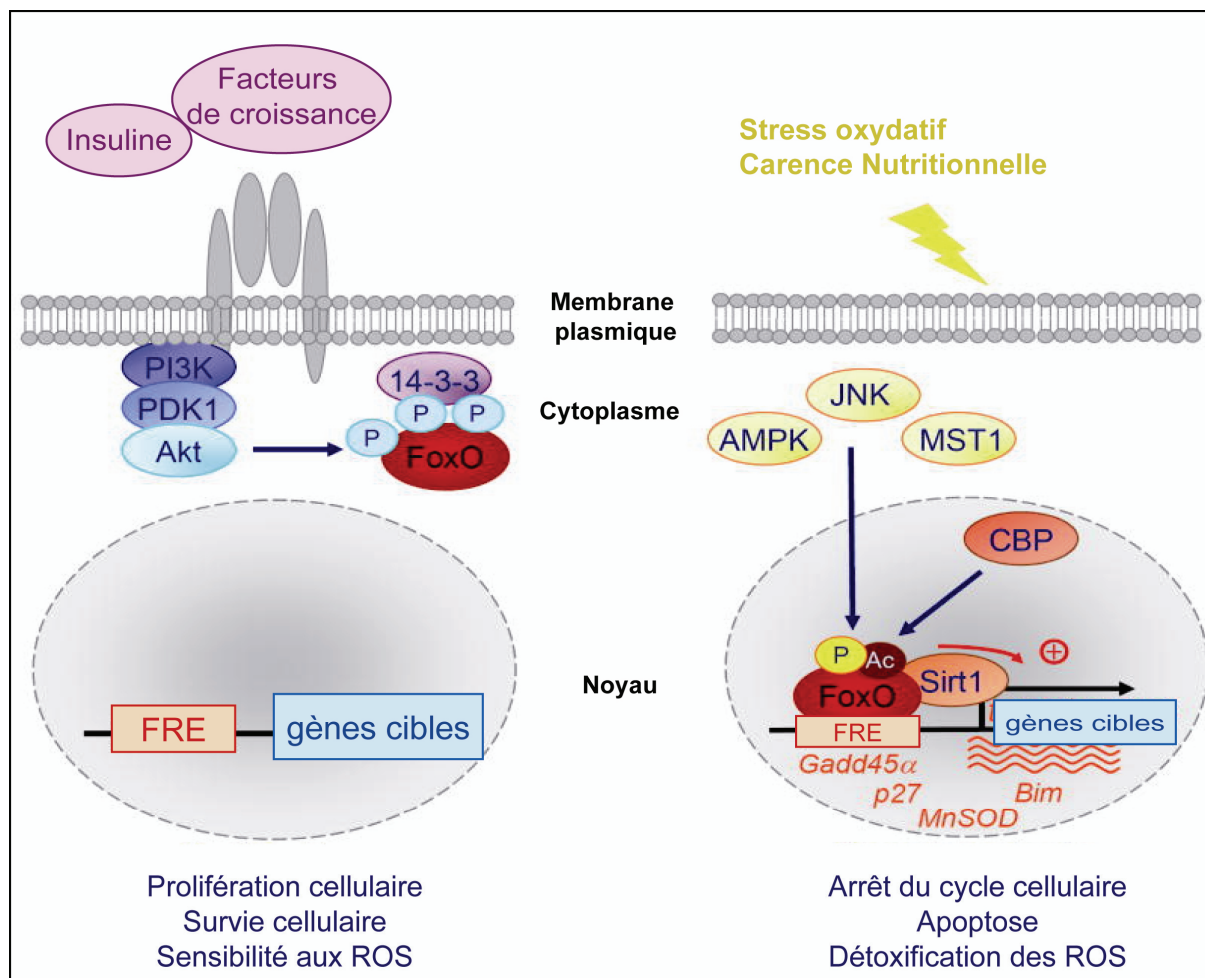


Figure 8 : Régulation négative des facteurs de transcription FoxO par les facteurs de croissance et l'insuline et régulation positive par le stress oxydatif et la carence nutritionnelle. 14-3-3 : protéine chaperon ; Ac : Acétylation ; AKT : AKR T cell lymphoma ; AMPK : AMP activated Protein Kinase ; BIM : BCL-2 Interacting Mediator of cell death ; CBP : CREB Binding Protein ; FoxO : Forkhead box transcription factors of the O class ; FRE : FoxO-Recognized Element ; GADD45 α : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45 α ; JNK : JUN-N-terminal Kinase ; MnSOD : Manganese Superoxyde Dismutase ; MST1 : Mammalian Ste20-like Kinase 1 ; P : Phosphorylation ; PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isoenzyme 1 ; PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase ; ROS : Reactive Oxygen Species ; Sirt1 : Sirtuin 1. Modifié d'après Salih et collaborateurs (2008).

Récemment, plusieurs études ont démontré que les facteurs de transcription FoxO, dans certaines conditions, activent la dégradation de protéines en mettant en jeu à la fois la voie protéasomale et la voie lysosomale (Zhao *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2008). L'activation de l'autophagie a été mise en évidence par l'induction de l'expression de gènes impliqués dans ce processus et en particulier le gène *gabarapl1*.

Dans certaines pathologies musculaires ou en cas de privation alimentaire, l'atrophie musculaire qui en résulte est caractérisée par l'activation de FoxO3 et par l'activation de l'autophagie. Une étude en micro-array a permis de mettre en évidence l'induction du gène *gabarapl1* et d'autres gènes caractéristiques de l'autophagie dans des muscles atrophiés de

souris en privation alimentaire et de rats atteints de cancers, de diabète ou présentant des problèmes rénaux (Lecker *et al.*, 2004). Une induction de l'expression des gènes *gabarapl1* et *lc3* a été ensuite confirmée dans des cellules de myotubes C2C12 par des expériences de RT-PCR quantitative et par western blotting suite à la surexpression de FoxO3 muté au niveau de ses résidus phosphorylables par AKT (Zhao *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été démontrés *in vivo* dans des muscles de souris atrophiés suite à une dénervation ou à un jeûne (Mammucari *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2007). Par ailleurs, des études menées *in vivo* à partir de muscles squelettiques de truites arc-en-ciel privées de nourriture pendant quatorze jours et *in vitro* à partir de myocytes de truites cultivés en absence de sérum révèlent une augmentation de l'expression de *gabarapl1* et d'autres gènes impliqués dans l'autophagie (*lc3b*, *atg12l*, *atg4b*). En revanche, l'étude *in vitro* montre également qu'une stimulation des cellules musculaires de truite par l'IGF-1 induit la phosphorylation de FoxO3 ce qui n'entraîne pas pour autant une forte diminution de l'expression des gènes d'autophagie dont *gabarapl1* (Seiliez *et al.*, 2010).

Sengupta et collègues ont également montré qu'en cas de privation de glucose, FoxO1 et FoxO3 sont déphosphorylés au niveau des résidus thréonine et sérines cibles de la kinase AKT et sont localisés dans le noyau de cardiomyocytes de rats nouveaux nés et de souris où ils activent la transcription des gènes *gabarapl1*, *lc3* et *atg12* impliqués dans le processus d'autophagie (Sengupta *et al.*, 2009). De plus, des souris dont les cardiomyocytes sont déficients en protéines FoxO1 et FoxO3 voient leur taux de protéines anti-oxydantes, catalase et SOD2 (superoxyde dismutase 2), et de protéine autophagique LC3-II, forme lipidée de LC3, diminués suite à une ischémie/reperfusion, opération qui accroît les taux de ces protéines chez des souris sauvages (Sengupta *et al.*, 2011). Dans cette étude, le taux du messager *gabarapl1* est également diminué suite à la perte de FoxO1 et FoxO3.

Par ailleurs, des souris en hyperinsulinémie ou présentant une résistance à l'insuline n'expriment plus les gènes autophagiques tels que *gabarapl1* au niveau de leurs hépatocytes. Cette suppression du processus d'autophagie par l'insuline implique directement la protéine FoxO1 dans le foie de souris (Liu *et al.*, 2009).

Les facteurs de transcription de la sous-famille FoxO sont depuis peu reconnus comme jouant un rôle dans les cancers en tant que suppresseurs de tumeurs (van der Horst and Burgering, 2007). Un lien entre FoxO3A, AMPK, p38 α MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et *gabarapl1* a pu être récemment mis en évidence dans des cancers colorectaux. En effet, une inhibition spécifique de p38 α par l'inhibiteur SB202190 entraîne une activation de

FoxO3A dépendante de l'AMPK conduisant à une activation de la transcription de gènes impliqués dans l'autophagie dont *gabarapl1*, *gabarap*, *lc3* et *atg12* dans les cellules humaines de cancer du colon HT29. L'expression de l'AMPK est requise car une inhibition de l'activité ou de l'expression de cette protéine, par l'inhibiteur Compound C ou par RNAi (RNA interférence) respectivement, n'aboutit plus à l'induction des gènes cibles de FoxO3A. Parmi ces gènes cibles, *gabarapl1* présente le taux d'induction le plus élevé au niveau du messenger et de la protéine (Chiacchiera *et al.*, 2009 ; Chiacchiera and Simone, 2009).

Zhao et collaborateurs ont mis en évidence, dans les cellules C2C12 de souris, par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, une interaction directe de FoxO3 avec trois séquences FRE contenues dans un fragment d'ADN de 5000 pb en amont du codon d'initiation de la traduction ATG du gène *gabarapl1*. Par cette même technique, dans des cardiomyocytes de rat, Sengupta et collaborateurs ont montré une interaction directe de FoxO1 et FoxO3 avec au moins un site FRE contenu dans la région promotrice des gènes *gabarapl1* et *atg12*, avec une augmentation de cette interaction en conditions de privation en nutriments (Sengupta *et al.*, 2009). Au laboratoire, l'analyse par des logiciels informatiques (Cister et Matinspector) d'une séquence de 1240 pb en amont de l'ATG du gène *gabarapl1* a révélé quatre sites potentiels de liaison de FoxO chez le cobaye et aucun site chez l'humain (Figure 7). Cependant, des sites sont présents dans une région plus éloignée de l'ATG (entre 2000 et 3000 pb en amont de l'ATG) chez le gène humain.

1.3.3 Régulation par les rythmes circadiens

L'horloge biologique centrale des mammifères est située au niveau du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus. Chez l'homme, cette horloge est réglée sur environ 24 heures. Elle gouverne l'organisation des rythmes circadiens du sommeil et de la vigilance, mais aussi de très nombreux rythmes physiologiques, dont celui de la température interne et biologiques comme la sécrétion d'hormones (hormone de croissance, cortisol, mélatonine), le rythme cardiaque, la fonction rénale, le métabolisme hépatique ou la fréquence respiratoire. (Gachon *et al.*, 2004 ; Reppert and Weaver, 2002 ; Ripperger and Schibler, 2001). De plus, la plupart des tissus, incluant des régions du cerveau hors noyau suprachiasmatique et des organes périphériques, renferment des oscillateurs périphériques pouvant fonctionner indépendamment de l'horloge centrale (Schibler *et al.*, 2003 ; Yoo *et al.*, 2004). Le cycle lumière-obscurité est le facteur synchronisateur le plus puissant de l'horloge suprachiasmatique mais d'autres facteurs dits non-photiques, tels que l'homéostasie de la prise alimentaire, participent à cette synchronisation. Les rythmes circadiens sont sous le

contrôle de plusieurs gènes dont l'expression varie selon le tissu considéré. Les protéines codées par ces gènes sont capables d'autoréguler leur propre expression. Parmi ces protéines, l'hétérodimère CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) /BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like protein 1) peut se fixer sur une séquence cis-régulatrice appelée boîte E au voisinage du promoteur des gènes *per 1, 2 et 3* (period gene) *cry 1 et 2* (cryptochrome gene) et *rev-erba* (*reverse orientation c-erba-1 gene α*) pour induire leur expression. Les protéines PER et CRY répriment ensuite l'expression des facteurs de transcription CLOCK et BMAL, résultant en l'inhibition de leur propre expression. La localisation et la dégradation des protéines PER sont en partie dépendantes de phosphorylations assurées par les isoformes ϵ et δ de la kinase CK1 (Caséine Kinase 1). La protéine REV-ERB α , un récepteur nucléaire orphelin, se fixe au niveau de la séquence RORE (Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element) dans la région promotrice du gène *Bmal1* ce qui se traduit par une régulation négative de *Bmal1* (Gekakis *et al.*, 1998 ; Ko *et al.*, 2009 ; Lowrey and Takahashi, 2004) (Figure 9).

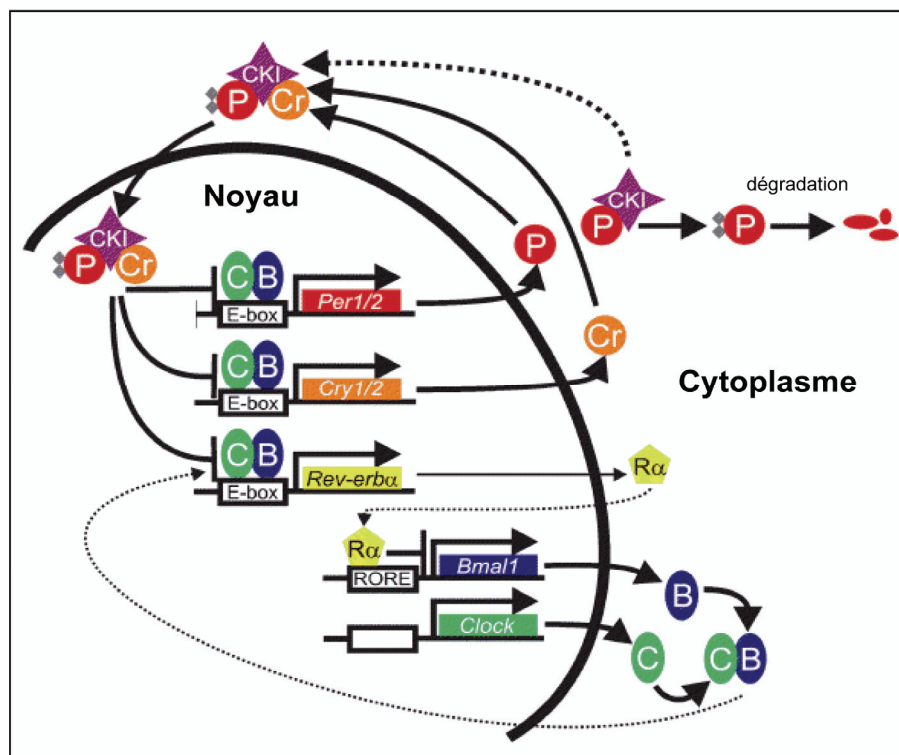


Figure 9 : Autorégulation des gènes contrôlant les rythmes circadiens dans le noyau suprachiasmatique. *Bmal1* (B): *Brain and Muscle ARNT-Like 1* ; *Clock* (C) : *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput* ; CK1 : Caséine Kinase 1 ; *Per* (P) : *period gene* ; *Cry* (C) : *cryptochrome gene* ; *Rev-erba* ($R\alpha$): *reverse orientation c-erba-1 gene α* ; RORE : Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element. Modifié d'après Lowrey et collaborateurs (2004).

Deux études menées dans le cerveau et dans le foie ont permis de montrer que l'expression de l'ARNm *gabapap11* est dépendante des rythmes circadiens (Mansuy *et al.*, 2009 ; Sakao *et al.*, 2003). Dans le foie, Sakao et collaborateurs ont mis en évidence, par analyse en micro-array et northern-blotting, un pic d'expression de *gabapap11* 6 h après exposition à la lumière chez des souris soumises à des cycles de 12 h de lumière/12 h d'obscurité. En revanche, chez des souris mutées pour le gène *clock*, ce pic n'est plus observé indiquant que CLOCK pourrait jouer un rôle dans la régulation de *gabapap11*.

Dans les cellules GnV-3 produites à partir de neurones à GnRH, l'expression de *gabapap11*, suite à un choc sérique, oscille de manière temporellement liée aux oscillations des facteurs de transcription d'horloge *bmal1*, *per1* et *cry1*. Par des expériences d'ARN interférence à l'aide de shRNA de *per1*, les auteurs ont pu mettre en évidence que ces variations d'expression de *gabapap11* sont dépendantes de *per1* (Mansuy *et al.*, 2009).

1.3.4 Régulation par E2F1

La protéine E2F1 est un facteur de transcription qui participe au contrôle de la prolifération cellulaire en stimulant le passage des cellules en phase S du cycle cellulaire. Cependant, cette protéine peut également induire l'apoptose.

Une étude portant sur la régulation transcriptionnelle de 23 gènes autophagiques humains par la protéine E2F1 a été réalisée (Kusama *et al.*, 2009). Les auteurs ont démontré, par des expériences de co-transfection transitoire utilisant des séquences de différentes tailles en amont du site d'initiation de la transcription des gènes autophagiques et un plasmide d'expression de E2F1, que 13 gènes sont significativement régulés par E2F1. Parmi ces 13 gènes, 12 sont régulés positivement et seul *gabapap11* est régulé négativement. L'analyse *in silico* propose une séquence cis-régulatrice cible de E2F1 dans une région de 335 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *gabapap11* humain. En parallèle, un traitement des cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa par de l'étoposide, utilisé pour induire l'apoptose, révèle une augmentation de l'expression de l'ARNm *gabapap11* dans des expériences de RT-PCR. Ces travaux suggèrent par conséquent un lien entre *gabapap11* et apoptose.

2 LA PROTEINE GABARAPL1, SES HOMOLOGUES, ET LEURS FONCTIONS

2.1 Les protéines de la famille GABARAP

La protéine GABARAPL1 appartient à la sous-famille GABARAP représentant une des deux sous-familles de la famille de protéines Atg8. Cette sous-famille GABARAP comprend les protéines GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 ou GATE-16 (Golgi-associated ATPase Enhancer of 16 kDa). Au sein de cette sous-famille, la protéine GABARAPL1 présente 87% d'identité avec GABARAP et 61% d'identité avec GATE-16. Ces protéines participent essentiellement au transport intracellulaire de protéine et/ou les événements de fusion membranaire. La seconde sous-famille constituant la famille Atg8 est celle des protéines MAP (Microtubule-Associated Proteins)-LC3 composée des protéines LC3A (chaîne légère de MAP1A), LC3B (chaîne légère de MAP1B) et LC3C (chaîne légère de MAP1C). GABARAPL1 présente une identité moindre avec les protéines LC3 : 30,8%, 29% et 35,8% d'identité avec LC3A, LC3B et LC3C respectivement (Le Grand *et al.*, 2011) et présente 55% d'identité avec l'orthologue chez la levure Atg8. Ces protéines sont principalement connues pour jouer un rôle dans le processus d'autophagie.

Toutes ces protéines sont de petite taille : 117 acides aminés pour GABARAPL1, GABARAP, GATE-16 et Atg8 ; 125 acides aminés pour LC3A et LC3B et 147 acides-aminés pour LC3C. Ces protéines ont la particularité de posséder un résidu glycine conservé dans leur partie C-terminale, en position 116 pour GABARAPL1, essentiel pour leur rôle dans le processus d'autophagie détaillé dans la partie 2.2. Les séquences des protéines de la famille Atg8 sont présentées dans la Figure 10.

Ces protéines sont hautement conservées dans l'évolution. La séquence de GABARAPL1 est totalement conservée des plantes aux mammifères, excepté chez l'orang-outan pour lequel le résidu histidine en position 99 est remplacé par un résidu arginine (Chen *et al.*, 2009). De nombreuses études ont été par la suite entreprises afin de caractériser les fonctions cellulaires des membres de la famille Atg8. Les protéines Atg8, GABARAP, GATE-16 et LC3 sont actuellement connues pour être impliquées dans les processus de fusion membranaire (Elazar *et al.*, 2003 ; Subramani and Farre, 2007), dans l'adressage des protéines à la membrane plasmique (Chen and Olsen, 2007) et dans le processus d'autophagie (Tanida *et al.*, 2004 ; Weidberg *et al.*, 2010).

GABARAPL1	MKFQYKEDHHPFEYRKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLDRKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLDKKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLRHRCVESA KIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRRKYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGKA AVDPADRCKEVQQIRDQHP SKIPVI IERYKGEKQLPVLDTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHP TKIPVI IERYKGEKQLPVLDTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFLPPLDKTKFLVLPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKRKAESER IADR FKNRIPV ICEK-AEKSDIPEIDKRRKYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNH EEDYFLYVAYSDES VY G K-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPTSATMGQLY Q EHHEED F FLYIAYSDES VY G L-117
GABARAPL2	MWIIIRKRIQLPSEKAI F LFVD-KTVPQSSLTMGQLYE K EKDE D GFLYVAYS G ENT F G F-117
LC3A	VKIIRRLQLNPTQ A FFLLVNGHSMVSVSTPIADI Y EQEKDE D GFLYMVYAS Q ET F G F-125
LC3B	IKIIRRLQLNANQ A FFLLVNGHSMVSVSTPISEV Y ESEKDE D GFLYMVYAS Q ET F G MKLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVL R ATE A FYLLVNNKSLVMSMATMAE I YRDYKDE D G F VYMTYAS Q ET F G CLESAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRI M LP E KA I F I FVN-DTLPPTAALMSA I Y Q EHKDK D GFLYV T YS G ENT F G R-117

Figure 10 : Comparaison de la séquence protéique humaine de GABARAPL1 avec celles de GABARAP, GABARAPL2 (GATE-16), LC3A, LC3B, LC3C et Atg8 (NCBI protein BLAST). En rouge sont indiqués les acides aminés qui diffèrent de ceux présents dans la protéine GABARAPL1 et en bleu la glycine terminale conservée (en position 116 pour GABARAPL1, GABARAP, GABARAPL2 et Atg8, 120 pour LC3B ou 124 pour LC3A et LC3C). Les séquences en acides aminés ont été obtenues à partir des bases de données NCBI ou GenBank. Les numéros d'accèsion sont : GABARAPL1 (NP_113600), GABARAP (CAG47031), GABARAPL2 (NP_009216), LC3A (NP_852610), LC3B (NP_073729), LC3C (NP_001004343) et Atg8 (NP_009475). D'après Le Grand et collaborateurs (2011).

En plus d'une forte homologie de séquence, les protéines de la famille Atg8 possèdent également une forte homologie de structure tridimensionnelle. Les structures cristallographiques des protéines GABARAPL1 (Structural Genomic Consortium, PDB code 2R2Q), GABARAP (Bavro *et al.*, 2002 ; Coyle *et al.*, 2002 ; Knight *et al.*, 2002), GATE-16 (Paz *et al.*, 2000) et LC3 (Sugawara *et al.*, 2004) ont pu être établies. L'extrémité aminotermine basique de ces protéines est composée de 2 hélices α , α_1 et α_2 , suivie d'une extrémité C-terminale acide comprenant une partie compacte constituée de 4 ou 5 feuillets β et de 2 hélices α , α_3 et α_4 (Figure 11). La charge globale de ces protéines est positive, avec un pHi de 8,9 pour la protéine GABARAPL1 dont une partie N-terminale de pHi égal à 9,6. Cette structure est très similaire à la structure tridimensionnelle de l'ubiquitine malgré une faible homologie de séquence entre l'ubiquitine et les membres de la famille Atg8. Les hélices α_1 et α_2 , absentes dans la structure de l'ubiquitine, sont caractéristiques des protéines de cette sous-famille.

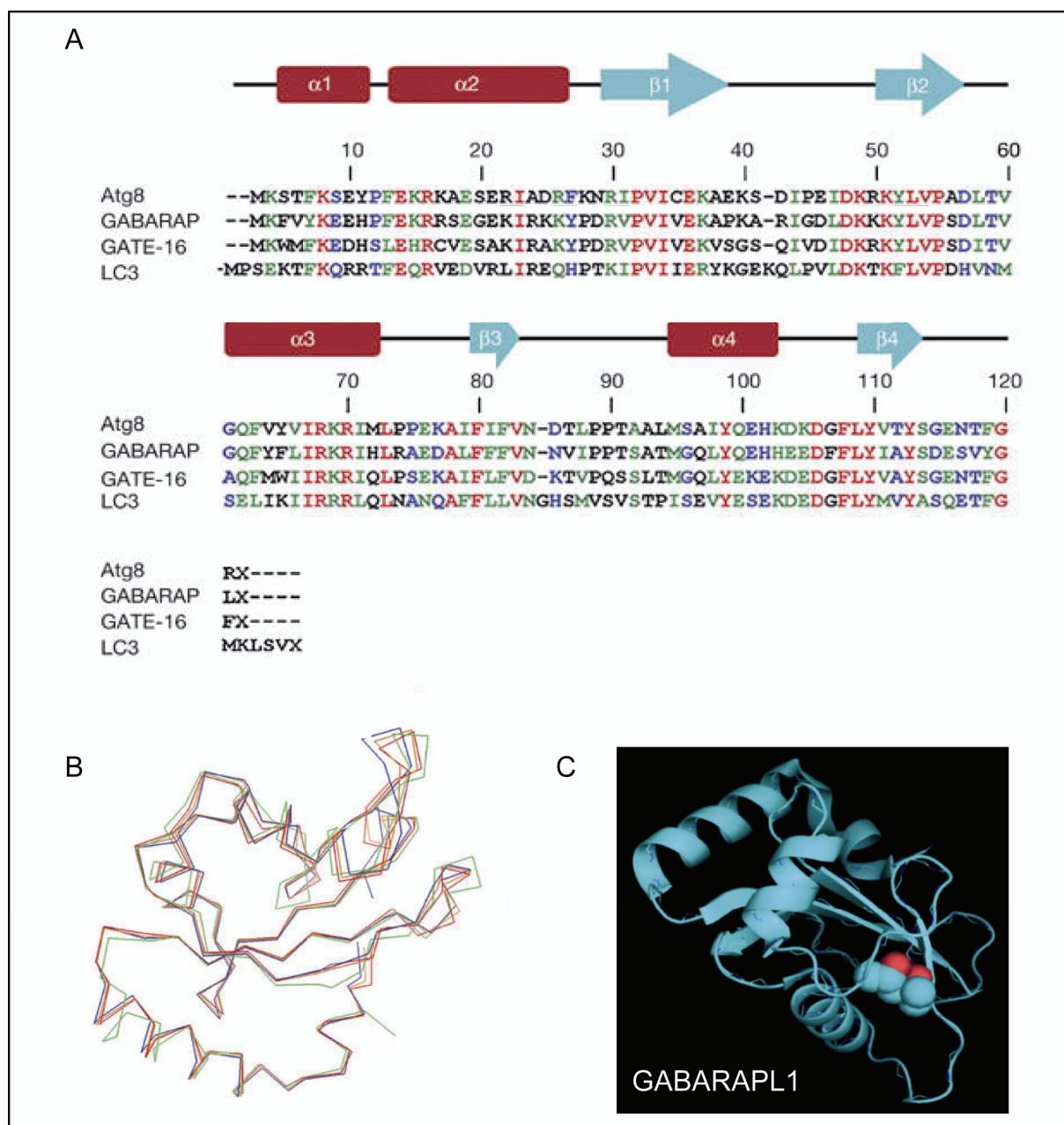


Figure 11 : Comparaison des séquences en acides aminés et des structures tridimensionnelles des protéines Atg8, GABARAP, GATE-16 et LC3 et représentation structurale de la protéine GABARAPL1. A. Alignement des séquences protéiques des protéines Atg8, GABARAP, GATE-16 et LC3. Les acides aminés indiqués en rouge sont conservés entre les différentes protéines, ceux en vert correspondent à des substitutions conservatives, ceux en bleu à des substitutions semi-conservatives et ceux en noirs ne présentent aucune similarité. En rouge, au-dessus des séquences, sont représentées les hélices α et en bleu les feuillets β . B. Alignements des structures tridimensionnelles des protéines Atg8 (en orange), GABARAP (en bleu), GATE-16 (en rouge) et LC3 (en vert). C. Structure tridimensionnelle de la protéine GABARAPL1 (Structural Genomic Consortium, PDB code 2R2Q, www.sgc.utoronto.ca). Modifié d'après Amar et collaborateurs (2006).

Par ailleurs, des études préliminaires, réalisées dans notre laboratoire, ont montré que GABARAPL1 est capable de s'homodimériser par mise en présence des protéines GST-GABARAPL1 et FLAG-GABARAPL1-6HIS dans des expériences de SPR (Surface Plasmon

Resonance) et de GST pull-down (§ 2.3). Cependant, le rôle biologique de ce mécanisme, s'il a lieu *in vivo*, reste encore à élucider. GABARAP peut elle aussi former des homo-dimères voire des oligomères et le domaine d'homo-dimérisation (acides aminés 41 à 51) correspond au domaine d'interaction de la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A (Coyle *et al.*, 2002 ; Nymann-Andersen *et al.*, 2002 ; Pacheco *et al.*, 2010). L'homo-dimérisation et la fixation à ce récepteur n'auraient par conséquent pas lieu simultanément. De la même manière, l'interaction GABARAPL1-GABARAPL1 pourrait empêcher la liaison de GABARAPL1 avec le récepteur GABA_A.

2.2 Localisation et expression de la protéine GABARAPL1 et de ses homologues

2.2.1 Localisation et expression de GABARAPL1

Du fait de la forte homologie existant entre les différents membres de la sous-famille GABARAP, et en particulier entre GABARAPL1 et GABARAP, peu d'études visant à localiser GABARAPL1 au niveau cellulaire ou à déterminer son profil d'expression tissulaire n'ont pu être menées jusqu'à présent. En effet, pendant longtemps, aucun anticorps n'était capable de discriminer ces deux protéines. Des anticorps polyclonaux dirigés contre GABARAPL1 commercialisés par différentes sociétés (RD-Biotech, Santa-Cruz Biotechnology, Protein Tech) ou produits au laboratoire ont été testés en western blotting à partir des protéines GST-GABARAP et GST-GABARAPL1 et en immunohistochimie à partir d'isocortex de cerveau de rat (Mansuy *et al.*, 2004 ; Tolle *et al.*, 2008). Il s'est révélé que ces anticorps ne discriminent pas les protéines GABARAPL1 et GABARAP dans les conditions testées. Seul l'anticorps commercialisé par la société Protein Tech semblait tout de même être plus spécifique de GABARAPL1 en immunohistochimie et en western-blotting (Tolle *et al.*, 2008). Cet anticorps anti-GABARAPL1 est en réalité utilisé par plusieurs équipes de recherche comme étant spécifique de la protéine GABARAPL1. De nouveaux tests de spécificité de cet anticorps, selon diverses conditions, ont été depuis menés au laboratoire. Des expériences d'immunohistochimie, immunocytochimie et de western blotting ont effectivement permis de montrer une spécificité accrue de cet anticorps pour GABARAPL1, comparativement aux autres anticorps testés jusqu'à présent, mais sans pour autant être totalement spécifique (article en préparation). L'équipe de Kassiotis a montré, par western blotting à l'aide de cet anticorps, que l'expression de GABARAPL1 et de LC3 est diminuée dans le cœur de patients atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique bénéficiant d'un

dispositif d'assistance ventriculaire gauche, traduisant une diminution de l'autophagie et par conséquent une diminution des besoins énergétiques du cœur ainsi assisté (Kassiotis *et al.*, 2009). Plusieurs équipes travaillant sur les protéines FoxO ont mis en évidence par immunofluorescence, d'une part, l'augmentation de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés privés en glucose, et d'autre part, une localisation punctiforme de GABARAPL1 dans des cellules cancéreuses de colon HT29 soumises à différents traitements (Chiacchiera and Simone, 2009 ; Sengupta *et al.*, 2009). La distribution de la protéine GABARAPL1 endogène a été recherchée, par immunofluorescence à l'aide de cet anticorps, dans des cellules rénales de singe COS M9 et cette étude a mis en évidence la présence de GABARAPL1 de manière ponctuée dans la région périnucléaire (Jiang *et al.*, 2010b).

Toutefois, plusieurs études réalisées avec d'autres anticorps anti-GABARAPL1 ont été entreprises. L'équipe de Chen a produit un sérum anti-GABARAPL1 décrit pour être spécifique de GABARAPL1 en immunohistochimie mais pouvant reconnaître à la fois GABARAP et GATE-16 en western blotting (Chen *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006). L'expression de la protéine GABARAPL1 a été recherchée chez le rat dans plusieurs organes et en particulier dans le cerveau. Par des expériences de western blotting, un fort taux d'expression de GABARAPL1 est observé dans le foie et le cerveau. Dans le cerveau, la protéine GABARAPL1 est majoritairement présente dans le putamen caudé, le noyau accumbens, l'hypothalamus, l'hippocampe et le thalamus. Des niveaux d'expression moins importants sont observés dans la moelle épinière, le pons, le bulbe olfactif. Le cervelet présente le niveau de GABARAPL1 le plus faible. Les poumons et le cœur présentent des taux plus modérés de GABARAPL1 et les taux les plus faibles sont observés dans les reins et le muscle squelettique (Wang *et al.*, 2006). D'après cette étude, ce profil d'expression de la protéine GABARAPL1 n'est pas totalement en accord pour certains organes, en particulier pour le poumon, avec celui obtenu par analyse de l'expression du message (Vernier-Magnin *et al.*, 2001). La microscopie électronique a confirmé la localisation de GABARAPL1 dans l'appareil de Golgi et dans le réticulum endoplasmique au niveau du corps cellulaire et des dendrites de neurones hypothalamiques de rat et cette même étude a également montré une distribution de GABARAPL1 dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique de ces neurones (Wang *et al.*, 2006). Ces derniers résultats sont toutefois à prendre avec précaution étant donné l'utilisation d'un anticorps probablement non entièrement spécifique de GABARAPL1.

Afin de s'affranchir du problème lié à la spécificité d'anticorps anti-GABARAPL1, la fusion de GABARAPL1 à différentes étiquettes a permis de localiser de manière plus pertinente cette protéine dans la cellule. GABARAPL1 est toujours distribuée de manière punctiforme dans le cytoplasme, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique ou la membrane plasmique selon le type de cellules étudiées. Les premières preuves d'une localisation cytoplasmique et punctiforme ont été rapportées par Mansuy et collaborateurs par surexpression des protéines GABARAPL1-GFP et GFP-GABARAPL1 dans des cellules CHO et IGEC (Mansuy *et al.*, 2004). L'utilisation de protéines marqueurs de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique a permis de démontrer la présence de GABARAPL1 au sein de ces compartiments subcellulaires dans les cellules CHO transfectées par la protéine HA-GABARAPL1, suggérant son association aux vésicules transitant par ces compartiments (Chen *et al.*, 2006). La transfection des protéines de fusion MYC-GABARAPL1 ou GFP-GABARAPL1 et FLAG-GABARAPL1 dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa et des cellules rénales de singe COS M9 respectivement montre également clairement une localisation de GABARAPL1 exogène au niveau de vésicules périnucléaires (Betin and Lane, 2009b ; Jiang *et al.*, 2010b ; Nakamura *et al.*, 2008 ; Pankiv *et al.*, 2007) (Figure 12). Par ailleurs, en condition de stress, la protéine GFP-GABARAPL1 peut être relocalisée au niveau des mitochondries dans des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) et dans des cellules HeLa (Novak *et al.*, 2010).

2.2.2 Localisation et expression de Atg8, GABARAP, GATE-16 et LC3

Les autres protéines de la famille Atg8 sont elles aussi exprimées de manière ubiquitaire et présentent une distribution intracellulaire similaire à celle de GABARAPL1, en particulier pour la protéine GABARAP qui est présente dans l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, le cytosol et les citernes postsynaptiques dans des neurones en culture (Kittler *et al.*, 2001 ; Kneussel *et al.*, 2000 ; Leil *et al.*, 2004), au niveau de vésicules périnucléaires dans des cellules HeLa, CHO et COS M9 (Green *et al.*, 2002 ; Jiang *et al.*, 2010b ; Nakamura *et al.*, 2008 ; Nowak *et al.*, 2009 ; Okazaki *et al.*, 2000 ; Pankiv *et al.*, 2007 ; Wang and Olsen, 2000) (Figure 12) et au niveau de la membrane plasmique dans des cellules PC12 différenciées (Kneussel *et al.*, 2000). Il est à noter que certaines de ces études ont été menées avec des anticorps anti-GABARAP, notamment dans des expériences d'immunohistochimie. Ces résultats sont donc à prendre avec précaution car on peut supposer que GABARAPL1 a pu également être reconnue dans ces études de localisation du fait de la forte homologie de

séquence partagée avec GABARAP (Kittler *et al.*, 2001 ; Kneussel *et al.*, 2000 ; Nakamura *et al.*, 2008 ; Okazaki *et al.*, 2000 ; Wang and Olsen, 2000).

Les protéines Atg8, GATE-16 et LC3 présentent une identité de séquence moindre avec GABARAPL1, permettant le développement d'anticorps spécifiques de ces protéines. La protéine GATE-16, initialement isolée à partir de l'appareil de Golgi de cerveau de bovin, est principalement exprimée au niveau de ce compartiment subcellulaire où elle participe au transport intra-Golgi de protéines liées à des vésicules en participant à la fusion de ces vésicules avec les saccules golgiens (Elazar *et al.*, 2003 ; Legesse-Miller *et al.*, 2000 ; Pankiv *et al.*, 2007 ; Sagiv *et al.*, 2000) (Figure 12).

Les protéines Atg8 et LC3 sont essentiellement localisées au niveau du cytoplasme et au niveau des autophagosomes et sont ainsi largement utilisées comme marqueurs de ces vésicules chez la levure et chez les mammifères respectivement (Jiang *et al.*, 2010b ; Kabeya *et al.*, 2000 ; Kirisako *et al.*, 2000 ; Lang *et al.*, 1998 ; Nowak *et al.*, 2009 ; Pankiv *et al.*, 2007) (Figure 12). Les isoformes humaines LC3A, B et C, bien qu'étant exprimées dans tous les tissus, présentent toutefois des profils d'expression tissulaire distincts (He *et al.*, 2003). Les protéines GABARAP et GATE-16 ont été identifiées par la suite comme étant également capables de s'associer à des vésicules autophagiques dans plusieurs lignées cellulaires (Kabeya *et al.*, 2004 ; Nowak *et al.*, 2009 ; Weidberg *et al.*, 2010). Une étude récente a également permis de montrer l'association de GFP-GABARAP et GFP-LC3 aux autophagosomes chez le poisson zèbre (He *et al.*, 2009). La co-localisation des protéines Atg8, LC3, GABARAP et GATE-16 avec des autophagosomes dans différents types cellulaires a permis de supposer un rôle de ces dernières dans le processus d'autophagie, rôle désormais clairement démontré par des études complémentaires.

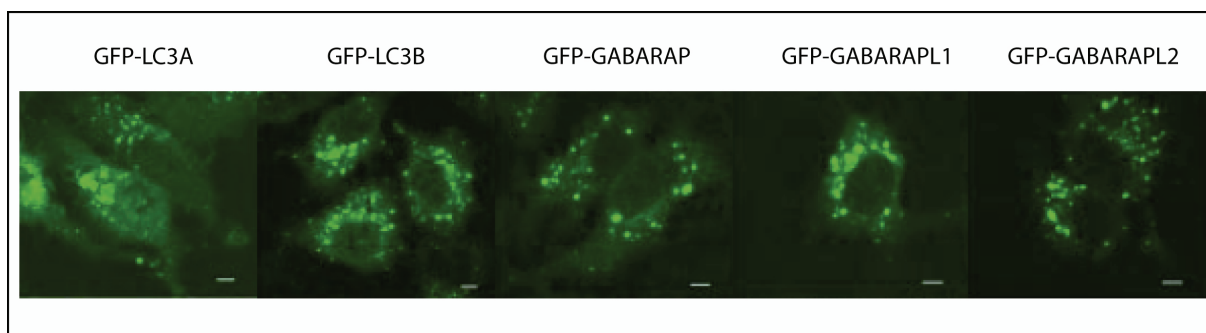


Figure 12 : Localisation des protéines GFP-LC3A, GFP-LC3B, GFP-GABARAP, GFP-GABARAPL1 et GFP-GABARAPL2 au niveau de vésicules périnucléaires dans des cellules HeLa. D'après Pankiv et collaborateurs (2007).

En conclusion, les protéines de la famille Atg8 sont exprimées dans tous les tissus et présentent une distribution cellulaire semblable, au niveau de vésicules intracytoplasmiques périnucléaires.

2.3 Les partenaires protéiques de GABARAPL1 et les fonctions cellulaires associées

L'expression ubiquitaire de l'ARNm *gabarapl1*, et probablement de la protéine GABARAPL1, et son haut degré de conservation durant l'évolution des espèces suggèrent une fonction importante de cette protéine dans la cellule. La découverte de partenaires d'une protéine permet parfois d'initier l'étude de son implication dans de nouveaux processus intracellulaires. La recherche de nouveaux partenaires de la protéine GABARAPL1 s'est fortement accentuée ces dernières années. En effet, tous les travaux antérieurs réalisés chez la levure ou *in vitro* n'ont pas permis de caractériser, de façon exhaustive, tous les partenaires de la protéine GABARAPL1 au niveau cellulaire. A ce jour, quatorze protéines interagissant *in vitro* et/ou *in vivo* avec GABARAPL1 ont été identifiées contribuant à sa caractérisation fonctionnelle. De plus, la majorité des protéines identifiées interagit avec un ou plusieurs autres membres de la famille Atg8 et ces dernières sont principalement impliquées dans le transport intracellulaire, en particulier dans le cerveau, ou dans le processus d'autophagie. Par ailleurs, l'expression différentielle de *gabarapl1* par rapport à *gabarap* dans les tissus et par rapport à *gabarapl2* et *lc3* dans le cerveau, suggère que cette protéine pourrait avoir des rôles distincts et interagir avec des partenaires spécifiques. Les partenaires actuels de la protéine GABARAPL1, leur interaction avec les autres membres de la famille GABARAP et la signification biologique possible de leur interaction sont regroupés dans le Tableau II et sont ensuite détaillés individuellement.

Partenaires identifiés de GABARAPL1	GABARAP	GATE-16	LC3	Techniques démontrant l'interaction avec GABARAPL1	Fonctions potentielles ou avérées de l'interaction avec GABARAPL1	Références de l'interaction avec GABARAPL1
Transport intracellulaire						
tubuline	oui	ND	oui	GST pull-down ; SPR	transport intracellulaire de récepteurs	(Chen <i>et al.</i> , 2006 ; Mansuy <i>et al.</i> , 2004)
sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A	oui	ND	ND	GST pull-down	transport intracellulaire du récepteur GABA _A	(Mansuy <i>et al.</i> , 2004)
PRIP1	oui	ND	ND	GST pull-down	transport intracellulaire du récepteur GABA _A	John Cashman, étudiant ERASMUS
KOR	oui	ND	ND	double-hybride ; GST pull-down ; immunoprécipitation	transport intracellulaire du récepteur KOR	(Chen <i>et al.</i> , 2006 ; Chen <i>et al.</i> , 2009)
récepteur AT₁ à l'angiotensine II	oui	ND	ND	double-hybride ; immunoprécipitation	transport intracellulaire du récepteur AT ₁	(Cook <i>et al.</i> , 2008)
NSF	oui	oui	ND	GST pull-down ; immunoprécipitation	transport de vésicules ; fusion membranaire	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
ARH	ND	ND	ND	double-hybride ; immunoprécipitation	endocytose médiée par la clathrine des récepteurs aux LDL ; croissance et élongation axonale	(Mameza <i>et al.</i> , 2007)
PX-RICS	oui	non	non	double-hybride ; GST pull-down ; immunoprécipitation	transport du complexe N-cadhérine/ β -caténine	(Nakamura <i>et al.</i> , 2008)
Autophagie						
p62	oui	oui	oui	GST pull-down ; immunoprécipitation	dégradation de protéines ubiquitinylées par autophagie	(Pankiv <i>et al.</i> , 2007 ; Rual <i>et al.</i> , 2005)
NBR1	oui	oui	oui	GST pull-down	dégradation de protéines ubiquitinylées par autophagie	(Kirkin <i>et al.</i> , 2009b)
Nix	oui	oui	oui	double-hybride ; GST pull-down	élimination de mitochondries lésées par mitophagie	(Novak <i>et al.</i> , 2010)
Stbd1	oui	ND	ND	double-hybride ; immunoprécipitation	dégradation du glycogène par autophagie	(Jiang <i>et al.</i> , 2010b)
GABARAPL1	ND	ND	ND	GST pull-down ; SPR	ND	(Berthier, 2008)
α-synucléine	ND	ND	ND	puce à protéines	dégradation d'agrégats de protéines dans les maladies neurodégénératives	(Schnack <i>et al.</i> , 2008)

Tableau II : Partenaires protéiques de GABARAPL1 ainsi que leur interaction potentielle avec GABARAP et/ou GATE-16 et/ou LC3. Les techniques ayant permis de mettre en évidence l'interaction avec GABARAPL1 ainsi que la fonction possible de l'interaction sont indiquées. ARH : Autosomal Recessive Hypercholesterolemia ; KOR : Récepteur κ aux Opioides ; LDL : Low Density Lipoprotein ; NBR1 [Neighbour of BRCA1 (BRCA1 CAnceR 1)] ; NSF : N-ethylmaleimide-Sensitive Factor ; PRIP1 : Phospholipase-C Related catalytically Inactive Protein type 1 ; PX-RICS : Phox-RhoGAP Involved in the β -Catenin-N-cadherin and NMDA receptor Signaling ; GABA_A : Gamma-AminoButyric Acid type A receptor ; Stbd1 : Starch binding domain1 ; ND : non déterminé.

2.3.1 Partenaires impliquant GABARAPL1 dans le transport intracellulaire de récepteurs

✓ GABARAPL1 et tubuline

La tubuline est la protéine structurelle des microtubules, constituant majeur du cytosquelette. Il existe deux isoformes α et β provenant de l'expression de deux gènes distincts. Elle dirige la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules et permet le transport de certaines protéines liées à des vésicules au sein de la cellule. La tubuline est l'un des premiers partenaires de GABARAPL1 à avoir été mis en évidence, suite à des expériences de GST pull-down dans le cerveau de rat (Mansuy *et al.*, 2004). De plus, l'interaction directe entre GABARAPL1 et la tubuline purifiée a été démontrée par GST pull-down et par des expériences de SPR (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006a ; Mansuy *et al.*, 2004). Cette interaction est assurée par des liaisons de type ionique car de hautes concentrations en sels provoquent la dissociation de ces deux protéines. De plus, l'utilisation d'un mutant de GABARAPL1 délété des 22 premiers acides N-terminaux a montré, par GST pull-down, que cette partie N-terminale est indispensable pour l'interaction avec la tubuline. Chen et collaborateurs ont par la suite également vérifié cette interaction directe et ils ont élaboré un modèle structural *in silico* de GABARAPL1 en se basant sur la structure tridimensionnelle de GABARAP (Chen *et al.*, 2006). La structure globulaire obtenue est nettement similaire à celle de GABARAP et la partie N-terminale basique composée de deux hélices α exposées décrite précédemment constitue ainsi la partie responsable de l'interaction avec la tubuline. GABARAP, LC3 et Atg8 sont également capables de s'associer directement à la tubuline par l'intermédiaire de cette partie N-terminale (Coyle *et al.*, 2002 ; Kouno *et al.*, 2005 ; Lang *et al.*, 1998 ; Mann and Hammarback, 1994 ; Wang *et al.*, 1999 ; Wang and Olsen, 2000). L'affinité de l'interaction GABARAPL1/tubuline est similaire à celle GABARAP/tubuline par SPR. Bien que l'interaction de GATE-16 avec la tubuline n'ait pas été démontrée à ce jour, elle est fortement suggérée par la présence du motif N-terminal partagé avec ses homologues.

Par ailleurs, des expériences de turbidimétrie ont mis en évidence que GABARAPL1, comme GABARAP, est capable de promouvoir la polymérisation de la tubuline en microtubules en présence de $MgCl_2$ seul et que cet effet est dépendant de la concentration de GABARAPL1 (Mansuy *et al.*, 2004). De ce fait, une interaction entre GABARAPL1 et les microtubules est largement suggérée.

✓ GABARAPL1 et sous-unité γ 2 du récepteur GABA_A

Le récepteur GABA_A fait partie de la superfamille des canaux ioniques incluant le récepteur à acétylcholine nicotinique, le récepteur de type 3,5-hydroxytryptamine et le récepteur à la glycine. Il existe trois classes de récepteurs au GABA (Gamma-AminoButyric Acid) : de type A, de type B, et de type C (Bormann, 2000 ; Chebib and Johnston, 1999). Les récepteurs GABA_A et GABA_C sont des canaux ioniques ligands dépendants, tandis que les récepteurs GABA_B sont couplés aux protéines G. Les récepteurs GABA_A sont exprimés de façon ubiquitaire dans le SNC. Le ligand du récepteur GABA_A est l'acide gamma-aminobutyrique, un des principaux neurotransmetteurs inhibiteurs du SNC. La fixation du GABA sur ce récepteur entraîne une rapide inhibition synaptique par augmentation de la perméabilité aux anions chlorures. Ces récepteurs participent au contrôle de l'excitabilité des neurones cérébraux et ainsi modulent l'anxiété, les rythmes circadiens, la cognition, la vigilance, la mémoire, et l'apprentissage (Michels and Moss, 2007).

Le récepteur GABA_A forme une structure hétéropentamérique résultant de l'assemblage de cinq sous-unités polypeptidiques appartenant à trois familles principales α (α 1- α 6), β (β 1- β 3) et γ (γ 1- γ 3). Dans le SNC, ces sous-unités sont synthétisées individuellement puis associées au niveau du réticulum endoplasmique sous forme d'un complexe, le plus souvent (α 1)₂(β 2)₂ γ 2 (Michels and Moss, 2007). Ce complexe est ensuite transporté jusqu'à l'appareil de Golgi puis exporté sous forme de canal fonctionnel à la membrane plasmique. Ce transport du Golgi vers la membrane et l'agrégation de ce récepteur au site post-synaptique requièrent la présence de la sous-unité γ 2 (Essrich *et al.*, 1998). Chaque sous-unité se compose d'un grand domaine extracellulaire amino-terminal où se fixe le ligand, de quatre domaines transmembranaires (TM) hydrophobes, avec un grand domaine intracellulaire phosphorylable entre TM3 et TM4 (Figure 13). La composition en sous-unités détermine l'affinité pour le GABA, et les effets spécifiques des modulateurs allostériques comme les benzodiazépines, les barbituriques ou les stéroïdes (Michels and Moss, 2007).

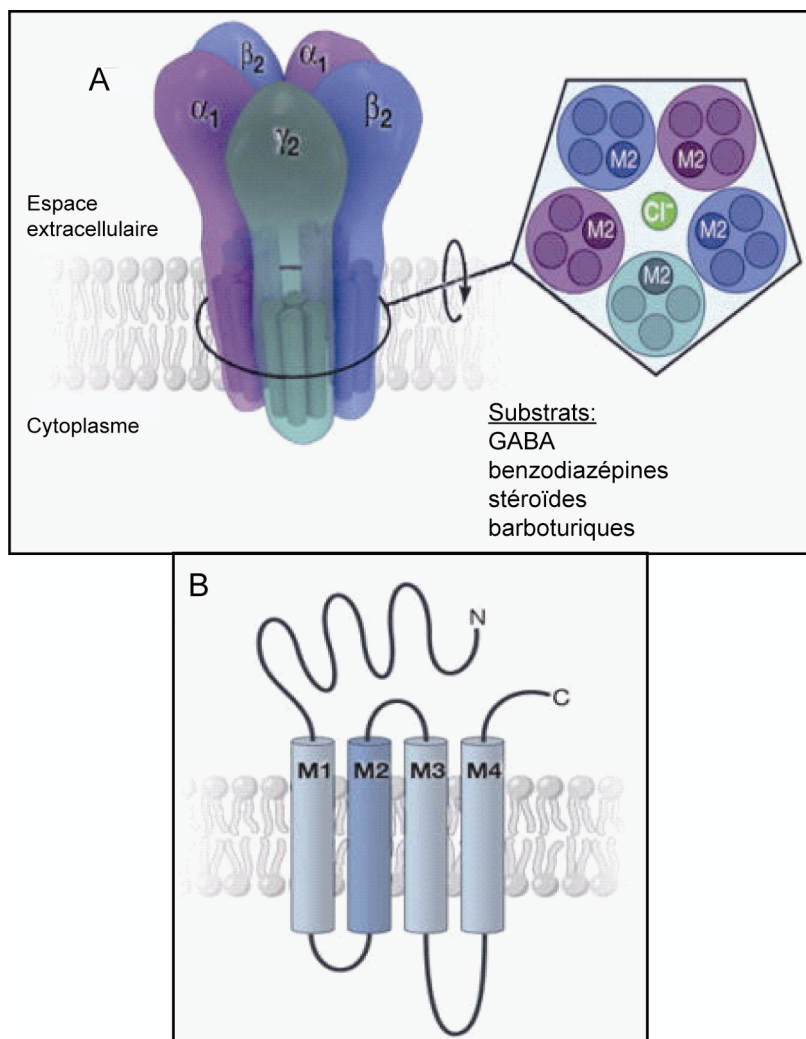


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur GABA_A composé des sous-unités $(\alpha 1)_2(\beta 2)_2\gamma 2$, combinaison la plus représentée dans le cerveau. **A.** Les 5 sous-unités sont associées entre elles et forment un canal permettant le passage des ions chlorure suite à la fixation de différents substrats. **B.** Structure d'une sous-unité composée de 4 domaines transmembranaires (M1, M2, M3, M4). D'après Meldrum et collaborateurs (2007).

Simultanément à l'identification de l'interaction entre GABARAPL1 et la tubuline, Mansuy et collaborateurs ont également mis en évidence, par GST pull-down, une liaison de GABARAPL1 à la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A à partir d'un extrait protéique de cerveau de rat. Cette interaction a été envisagée suite à l'identification de GABARAP comme étant un partenaire de cette sous-unité (Kittler *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 1999). Des expériences de GST pull-down ont montré un rôle essentiel des acides aminés 36 à 68 de GABARAP dans cette interaction (Wang *et al.*, 1999). Le domaine de GABARAPL1 mis en jeu n'est pas déterminé mais, étant donné la forte identité de séquence entre GABARAPL1 et GABARAP, les acides aminés 36 à 68 de GABARAPL1 sont également probablement nécessaires à l'interaction avec $\gamma 2$ (Figure 14).

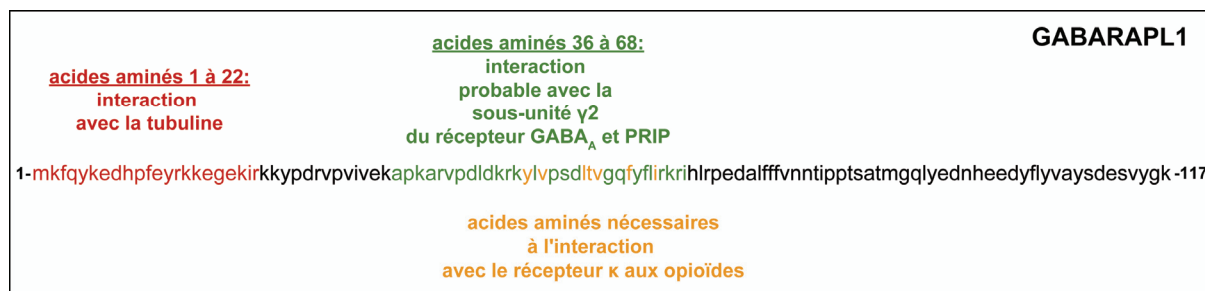


Figure 14 : Acides aminés de la protéine GABARAPL1 responsables de l'interaction avec la tubuline, avec le récepteur κ aux opioïdes et potentiellement avec la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur $GABA_A$. $GABA_A$: Gamma-AminoButyric Acid type A receptor ; PRIP1 : Phospholipase-C Related catalytically Inactive Protein type 1

✓ GABARAPL1 et PRIP1

La famille PRIP est composée uniquement de deux protéines : PRIP1 et PRIP2 qui se différencient par leurs profils d'expression. PRIP1 est préférentiellement localisée dans le SNC alors que PRIP2 est plus largement exprimée dans les différents tissus (Kanematsu *et al.*, 2005). PRIP1 interagit avec l'inositol-1,4,5-trisphosphate et présente une organisation structurale similaire à celle de la protéine phospholipase C- δ mais sans pour autant posséder son activité catalytique (Hirata *et al.*, 1998 ; Kanematsu *et al.*, 1996). PRIP1 intervient notamment dans le transport intracellulaire du récepteur $GABA_A$ en interagissant avec la sous-unité β du récepteur et avec la protéine GABARAP au niveau de son domaine d'interaction avec la sous-unité $\gamma 2$. PRIP1 semble également jouer un rôle important dans l'endocytose du récepteur $GABA_A$ en s'associant à des phosphatases PP1 (Protein Phosphatase 1) et PP2A (Protein Phosphatase 2A) responsables de la déphosphorylation des sous-unités β de $GABA_A$ (Kanematsu *et al.*, 2002 ; Kanematsu *et al.*, 2007 ; Mizokami *et al.*, 2007). Au laboratoire, un étudiant ERASMUS, John Cashman, a montré une interaction de GABARAPL1 avec PRIP par GST pull-down à l'aide de protéines de fusion et on suppose que les acides aminés impliqués sont les mêmes que ceux de GABARAP (Figure 14).

Implication de GABARAPL1 dans le transport du récepteur $GABA_A$

GABARAPL1 interagit de façon simultanée avec la tubuline et la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur $GABA_A$, interagit avec PRIP1 et est localisée au niveau de vésicule. L'ensemble de ces données suggère que GABARAPL1 pourrait former un complexe avec ces différentes protéines, ce qui favoriserait le transport du récepteur $GABA_A$ le long des microtubules. La protéine GABARAPL1 serait ainsi essentielle à la fonction physiologique inhibitrice de ce

récepteur. Cette hypothèse est renforcée par le fait que GABARAP, homologue le plus proche de GABARAPL1, joue effectivement un rôle fondamental dans le transport et dans l'agrégation de ce récepteur et aurait une moindre importance dans son ancrage au niveau de la membrane plasmique (Chen et al., 2000 ; Chen et al., 2005 ; Leil et al., 2004). GABARAP, pour exercer son action, interagit avec d'autres protéines telles que NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor), GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1), PRIP1, ULK1 (Unc-51-Like Kinase 1) ou la géphyrine (Chen and Olsen, 2007 ; Mohrluder *et al.*, 2009) (Figure 15).

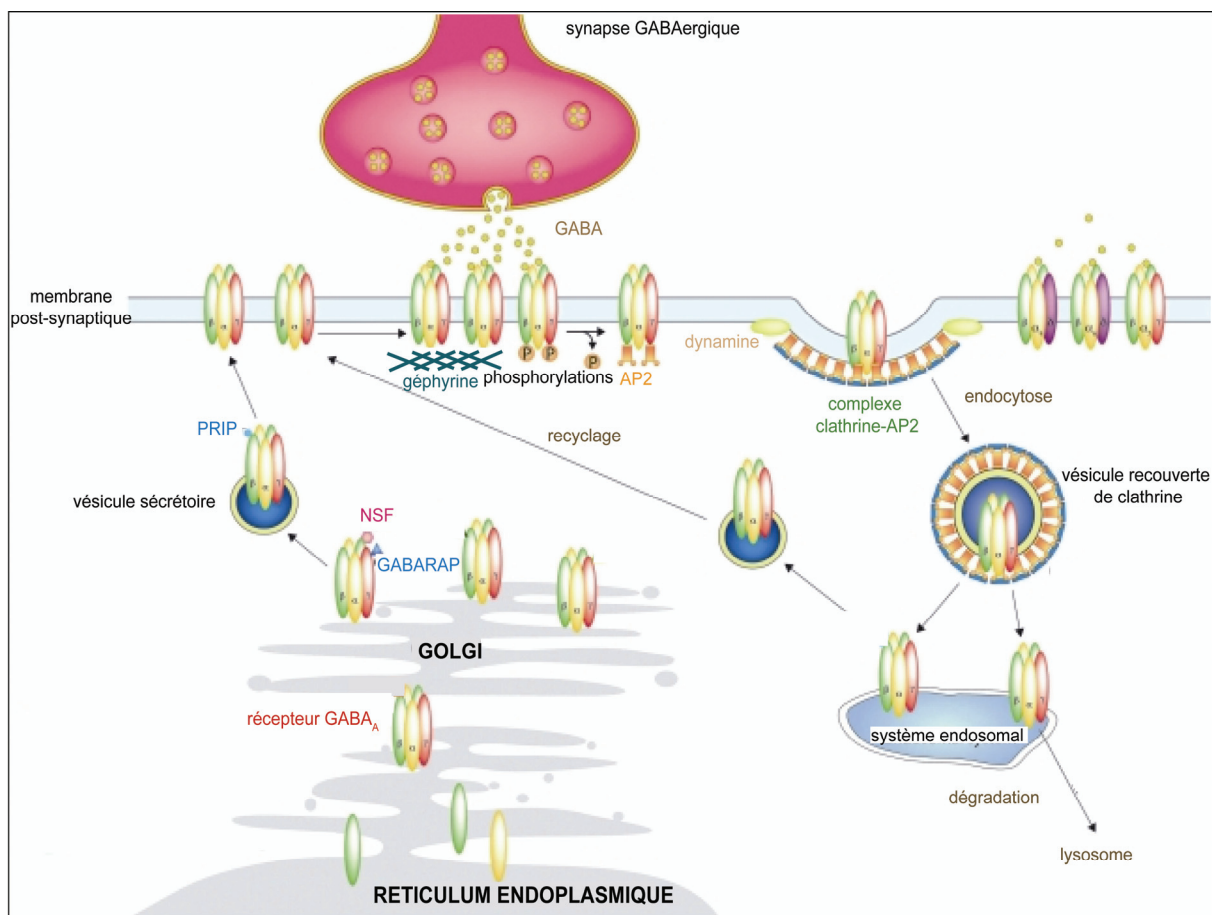


Figure 15 : Représentation schématique de la dynamique cellulaire des récepteurs GABA_A. Le récepteur GABA_A est assemblé dans le réticulum endoplasmique puis transporté *via* l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique. Ce transport fait intervenir des vésicules de sécrétion avec l'association des diverses protéines : GABARAP (GABA_A Receptor-Associated Protein), NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) et PRIP1 (Phospholipase-C Related catalytically Inactive Protein type1). La géphyrine est impliquée dans l'agrégation des récepteurs dans la membrane post-synaptique. Une fois le neurotransmetteur GABA (Gamma-AminoButyric Acid) libéré, les récepteurs GABA_A sont phosphorylés puis internalisés par endocytose à l'aide des protéines AP-2 (dAaptator Protein 2), dynamine et clathrine. A ce stade, les récepteurs sont recyclés ou dégradés. Modifié d'après Tretter et collaborateurs (2008).

On peut donc envisager que GRIP1, ULK1 et la géphyrine constituent des partenaires potentiels de GABARAPL1. L'interaction de GABARAPL1 avec NSF et son rôle potentiel seront détaillés par la suite.

Par ailleurs, des expériences d'inactivation du gène *gabarap* chez des souris supportent également l'idée voulant que GABARAPL1 favorise le transport du récepteur GABA_A à la membrane plasmique (O'Sullivan *et al.*, 2005). En effet, la localisation et le nombre de récepteurs GABA_A à la membrane plasmique est inchangé et aucun phénotype particulier n'est associé à ces souris mutantes. De plus, ni *gabarapl1*, ni *gabarapl2* ne sont surexprimés. L'ensemble de ces observations suggère que GABARAP n'est pas la seule protéine responsable du transport et la localisation synaptique du récepteur GABA_A, soutenant encore l'hypothèse d'un rôle de GABARAPL1 dans le trafic de ce récepteur dans le cerveau. De plus, des expériences de siRNA (small interfering RNA) ciblant le messenger *gabarap* dans des neurones primaires d'hippocampe engendrent des résultats similaires (Marsden *et al.*, 2007).

Les protéines GABARAP et GABARAPL1 pourraient ainsi avoir une fonction redondante pour le transport de ce récepteur. Un double « knock out » *gabarap/gabarapl1* permettrait d'évaluer le rôle coopératif de ces deux protéines *in vivo*.

✓ GABARAPL1 et KOR (Récepteur κ aux Opioïdes)

Le récepteur κ aux opioïdes appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et plus particulièrement à la sous-famille de la rhodopsine. Les mécanismes d'activation intracellulaire de ces récepteurs passent par le couplage à une protéine G de nature variable selon les tissus. Les récepteurs de cette famille possèdent tous la particularité d'être composés de sept segments transmembranaires. Sur la base de divers effets pharmacologiques observés en présence de différentes substances opiacées ou de leurs dérivés, l'existence de plusieurs types de récepteurs aux opioïdes a été considérée. La famille des récepteurs aux opioïdes est composée de trois membres principaux, δ, μ et κ largement distribués dans le système nerveux central (Mansour *et al.*, 1995). L'activation de ces récepteurs, *in vivo*, entraîne divers effets physiologiques impliqués dans l'antinociception, la diurèse et la mémorisation (Daumas *et al.*, 2007 ; Dykstra *et al.*, 1987). Cette activation est réalisée par des peptides endogènes sélectifs : enképhalines pour le récepteur δ, des β-endorphines pour le récepteur μ et des dynorphines pour le récepteur κ, produites principalement par le SNC (Janecka *et al.*, 2004). Des

molécules alcaloïdiques exogènes sélectives comme la morphine pour le récepteur μ ou non sélectives comme la méthadone activent de la même manière ces récepteurs (Waldhoer *et al.*, 2004).

Les travaux de Chen et collaborateurs ont montré, par la technique de double-hybride, par GST pull-down et par immunoprécipitation, une interaction de type hydrophobe directe de GABARAPL1 avec le KOR humain composé de 380 acides aminés. Des expériences de GST pull-down ont montré un rôle essentiel des acides aminés 38 à 117 de GABARAPL1, en particulier de sept résidus (Tyr⁴⁹, Val⁵¹, Leu⁵⁵, Thr⁵⁶, Val⁵⁷, Phe⁶⁰, Ile⁶⁴) (Figure 14) s'étendant du feuillet β 2 à l'hélice α 3 et des acides aminés 334 à 360 de KOR, en particulier de trois résidus (Phe³⁴⁶, Pro³⁴⁷ et Met³⁵⁰) (Chen *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2009). L'interaction intra-moléculaire des résidus Leu⁴⁴ et Tyr¹⁰⁹ de GABARAPL1 est importante pour son association au KOR, car elle permet certainement le maintien de son intégrité structurale. En revanche, GABARAPL1 n'interagit pas avec la partie C-terminale des récepteurs μ et δ . Par double-hybride, la protéine GABARAP a également été identifiée comme interagissant avec la partie C-terminale du KOR mais l'interaction étant plus faible que celle GABARAPL1/KOR, elle n'a pas été confirmée *in vivo* et le domaine de GABARAP responsable de l'interaction n'a pas été caractérisé.

Implication de GABARAPL1 dans le transport du récepteur KOR

Chen et collaborateurs, en plus d'avoir décrits une interaction de GABARAPL1 avec KOR, ont également démontré un rôle de GABARAPL1 dans le transport intracellulaire de ce récepteur (Chen *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2009). En effet, la surexpression de GABARAPL1 dans des cellules CHO augmente l'expression du KOR de 90% et son abondance à la surface cellulaire de 130%. La surexpression des protéines GABARAP et GATE-16 entraîne le même effet qui est néanmoins moins important que celui engendré par la surexpression de GABARAPL1. De plus, cette augmentation membranaire du nombre de KOR est considérablement amoindrie lors de la surexpression de la protéine GABARAPL1 (38-117) tronquée dans sa partie N-terminale, alors que l'augmentation globale d'expression du KOR reste inchangée. Ainsi, les 37 premiers acides aminés de GABARAPL1, correspondant à une portion de la région responsable de l'interaction avec la tubuline, semblent jouer un rôle important dans l'augmentation du nombre de KOR à la surface cellulaire (Chen *et al.*, 2006).

Le motif de liaison de GABARAPL1 est FPXXM. De manière intéressante, ce motif particulier est retrouvé dans la séquence C-terminale de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA [2-Amino-3-(5-Methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) Propanoic Acid] au glutamate de type 1 ainsi qu'un motif semblable, FPXM, dans la séquence C-terminale du récepteur à la prostaglandine EP3.f. La surexpression de GABARAPL1 dans les cellules CHO provoque l'augmentation de l'expression de ces récepteurs suggérant, d'une part, une interaction de GABARAPL1 avec ces récepteurs et, d'autre part, un rôle plus général de GABARAPL1 dans le transport intracellulaire de divers récepteurs (Chen *et al.*, 2009). La mutation du résidu valine en position 57 en alanine, crucial pour l'interaction avec le récepteur KOR, diminue également l'effet de la surexpression de GABARAPL1 muté sur ces récepteurs. En conclusion, les auteurs proposent une fonction de GABARAPL1 similaire à celle des protéines chaperons. Le transport de KOR et éventuellement des autres récepteurs pourrait de plus s'effectuer grâce à la liaison simultanée de GABARAPL1 avec la tubuline.

✓ GABARAPL1 et le récepteur AT₁ à l'angiotensine II

L'angiotensine II est la substance biologiquement active du système rénine-angiotensine. Elle est issue du clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou par la chymase. L'angiotensine II est un régulateur important de la pression artérielle, contrôle l'équilibre électrolytique et la sécrétion d'aldostérone et de vasopressine (Jagadeesh, 1998). Ses effets physiologiques sont liés principalement à la stimulation du récepteur AT₁ à l'angiotensine II. L'angiotensine II peut également se fixer sur le récepteur AT₂ surtout exprimé au cours de la vie fœtale. Les récepteurs AT₁ et AT₂ appartiennent à la famille des RPCG (de Gasparo *et al.*, 2000) et ont des rôles antagonistes.

Une interaction de GABARAPL1 et de GABARAP avec le récepteur AT₁ a été démontrée par double-hybride et par immunoprécipitation dans des cellules CHO (Cook *et al.*, 2008). L'éventuelle fonction de cette interaction n'a pas été explorée par les auteurs (Cook *et al.*, 2008). En revanche, celle-ci a été recherchée pour GABARAP. La surexpression de GABARAP dans des cellules PC12 entraîne une augmentation de l'expression de ce récepteur ainsi qu'une élévation de son taux à la membrane plasmique. De la même façon, GABARAPL1 pourrait ainsi participer au transport intracellulaire de ce récepteur.

✓ GABARAPL1 et NSF

La protéine NSF est une ATPase homo-hexamérique cytoplasmique appartenant à la famille de protéines AAA (ATPase Associated with a variety of Activities) (Hanson *et al.*, 1997). Cette protéine joue un rôle crucial dans les processus de fusion membranaire (Burd *et al.*, 1997 ; Robinson *et al.*, 1997 ; Rothman, 1994) et dans le transport des récepteurs AMPA au glutamate et β -adrénergiques (Whiteheart and Matveeva, 2004). Elle peut se lier à des protéines adaptatrices, les SNAPs (Soluble NSF Adaptator Proteins). Les protéines membranaires réceptrices des SNAPs qui constitueraient un motif de reconnaissance entre vésicules de transport et membranes cibles sont les SNAREs (SNAPs REceptors). L'une des protéines SNARE se trouve dans la membrane des vésicules (R-SNARE ou v-SNARE), c'est le cas de la synaptobrevine ou de VAMP2 (Vesicle-Associated Membrane Protein 2). L'autre protéine SNARE est appelée Q-SNARE ou t-SNARE et se trouve sur la membrane cible, c'est le cas des syntaxines ou Qa-SNAREs, de la protéine SNAP-25 (Synaptosome-Associated Protéin of 25 kDa) et des protéines de type SNAP-25 dénommées également Qb SNARE ou Qc SNARE en fonction de l'homologie de leur domaine SNARE avec la partie N-terminale ou C-terminale de SNAP-25. La protéine NSF participe aux événements de fusion membranaire en permettant la dissociation des complexes R-SNARE/ Q-SNAREs (Jahn and Scheller, 2006 ; Leabu, 2006) (Figure 16).

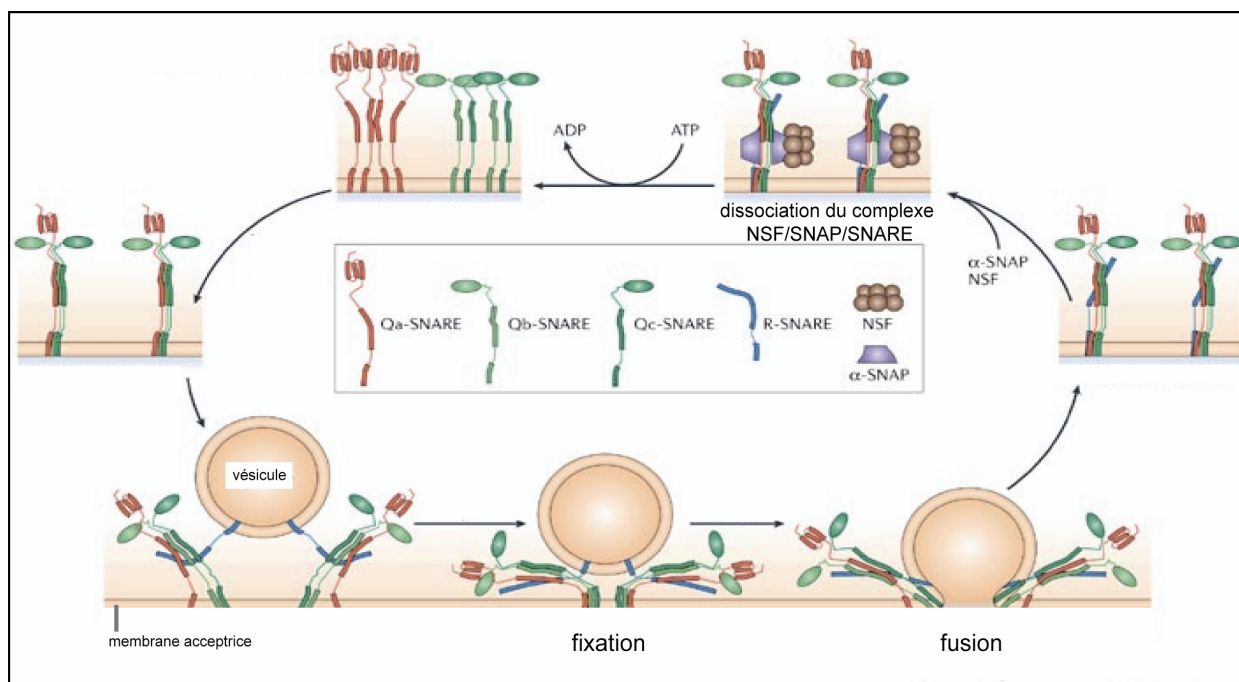


Figure 16 : Mécanisme de transport SNARE-NSF dépendant. Les événements de fusion membranaire nécessitent les protéines NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor), SNAP (Soluble NSF Adaptor Protein) et SNAREs (SNAP REceptors). La formation d'un complexe de fusion met en jeu l'appariement de R-SNARE et de Q-SNAREs, spécifiques des deux compartiments à fusionner, la vésicule et la membrane cible respectivement. D'après Jahn et collaborateurs (2006).

Chen et collaborateurs ont démontré, par GST pull-down à partir de cellules CHO et par immunoprécipitation à partir de cerveau de rat, une interaction entre GABARAP1 et NSF (Chen *et al.*, 2006). GABARAP et GATE-16 sont elles aussi capables de former un complexe avec la protéine NSF (Kittler *et al.*, 2001 ; Leil *et al.*, 2004 ; Sagiv *et al.*, 2000). Récemment, par analyse informatique de la structure de NSF, un éventuel site de liaison de NSF à GABARAP et GATE-16 a été proposé (Thielmann *et al.*, 2009), suggérant que ce site peut également être nécessaire pour la liaison avec GABARAP1.

La protéine NSF pourrait jouer un rôle important pour le transport intracellulaire des récepteurs GABA_A et KOR. Une association directe de NSF avec la sous-unité β du récepteur GABA_A a par ailleurs été mise en évidence (Goto *et al.*, 2005). La conséquence biologique de l'interaction NSF/GABARAP1 reste à ce jour indéterminée. On peut toutefois supposer une fonction équivalente à celle de GABARAP ou GATE-16. GATE-16, liée au NSF interagit avec la protéine endomembranaire v-SNARE GOS-28 (28 kDa Golgi SNARE protein) spécifique des vésicules golgiennes, et active l'activité ATPasique de NSF (Muller *et al.*, 2002 ; Sagiv *et al.*, 2000). Il en résulte la fusion des endomembranes cibles et plus

généralement le transport de protéines entre les saccules de l'appareil de Golgi. GABARAPL1 pourrait donc à son tour permettre une telle activation de NSF pour favoriser le transport des récepteurs auquel il est associé.

L'association de GABARAPL1 avec plusieurs récepteurs membranaires, en particulier dans le SNC, met en évidence un rôle de GABARAPL1 dans l'acheminement de ces récepteurs à la membrane plasmique. Cependant, l'expression ubiquitaire de GABARAPL1 suggère que son rôle ne se limite certainement pas au trafic intracellulaire de récepteurs dans le cerveau.

✓ GABARAPL1 et ARH (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia)

La protéine ARH est impliquée dans les processus d'endocytose médiés par la clathrine des récepteurs aux LDL (Low Density Lipoprotein) *via* sa fixation par son domaine PTB (PhosphoTyrosine Binding) avec le domaine FxNPxY/NPxY C-terminal de ces récepteurs (Jones *et al.*, 2003). La fonction d'ARH dans le cerveau n'est pas réellement définie. La croissance et la régénération d'axones, et donc l'expansion de membrane, sont conditionnées par l'addition de nouveau matériel membranaire tel que des lipides et des protéines. Les corps cellulaires et les axones des neurones expriment différents sous-types de récepteurs membranaires aux LDL comme LRP1 (récepteur de type 1 aux LDL), qui sont endocytés après avoir fixé leurs ligands. En cas de croissance accrue, l'endocytose de ces récepteurs aux LDL est accélérée par la liaison de la protéine ARH.

Récemment, Mameza et collaborateurs ont démontré une interaction entre GABARAPL1 et ARH par la technique de double-hybride chez la levure et par immunoprécipitation dans les cellules embryonnaires de rein humain HEK293 (Mameza *et al.*, 2007). Cependant, le domaine PTB d'ARH seul n'est pas suffisant pour cette association. L'interaction ARH/GABARAPL1 pourrait participer à l'endocytose des récepteurs aux LDL et à l'acheminement de ces vésicules d'endocytose chargées de LDL vers l'endosome, d'où un rôle potentiel dans la croissance et l'élongation axonale.

✓ GABARAPL1 et PX-RICS [PhoX-RhoGAP (GTPase-Activating Protein) Involved in the β -Catenin-N-cadherin and NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) receptor Signaling]

La protéine PX-RICS est un variant d'épissage de la protéine RICS (RhoGAP Involved in the β -Catenin-N-cadherin and NMDA receptor Signaling) et est exprimée dans de nombreux tissus et lignées cellulaires (Hayashi *et al.*, 2007). PX-RICS intervient dans le transport intracellulaire du complexe N-cadhérine/ β -caténine associé au niveau du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi, en interaction avec différentes protéines telles que CDC42 (Cell Division Cycle 42), PI4P (Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphate) ou les isoformes θ et ζ de la protéine 14-3-3 (Nakamura *et al.*, 2010 ; Nakamura *et al.*, 2008). GABARAPL1 et GABARAP interagissent de façon directe avec PX-RICS (Nakamura *et al.*, 2008). Cependant, par des expériences de shRNA, les auteurs ont montré que l'association de GABARAPL1, contrairement à celle de GABARAP, n'est pas essentielle au transport du complexe N-cadhérine/ β -caténine à travers ces compartiments.

2.3.2 Partenaires impliquant GABARAPL1 dans le processus d'autophagie

Deux voies principales de dégradation des protéines coexistent au sein de la cellule : la voie du protéasome qui cible généralement des protéines ubiquitinylées à courte durée de vie et la voie autophagique, décrite à l'origine comme non spécifique, dégradant des protéines à longue durée de vie et faisant intervenir les lysosomes.

Le processus d'autophagie, conservé chez toutes les cellules eucaryotes (Reggiori and Klionsky, 2002), a été décrit initialement chez la levure (De Duve, 1963). C'est un processus catabolique aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires voire de la totalité de la cellule par la vacuole chez la levure ou par les lysosomes chez les mammifères. Les constituants cibles de l'autophagie sont des protéines à longue durée de vie et des organites en excès ou endommagés tels que les mitochondries (mitophagie) ou les peroxysomes (pexophagie). Ce processus de dégradation participe donc à l'homéostasie cellulaire en permettant le recyclage de macromolécules nécessaires dans des conditions normales et il permet également la survie cellulaire dans des conditions de stress. En effet, l'autophagie est un mécanisme adaptatif de la cellule, activé en réponse à de nombreux stress comme la privation en acides aminés ou facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif, des lésions de l'ADN, la présence d'agrégats protéiques ou d'organites endommagés ou l'infection par des pathogènes (Kroemer *et al.*, 2010) (Figure 17). Paradoxalement, lorsque les conditions sont trop défavorables pour la cellule, l'autophagie participe à la mort cellulaire et c'est

pourquoi on parle également de mort programmée de type II (de Bruin and Medema, 2008 ; Morselli *et al.*, 2009).

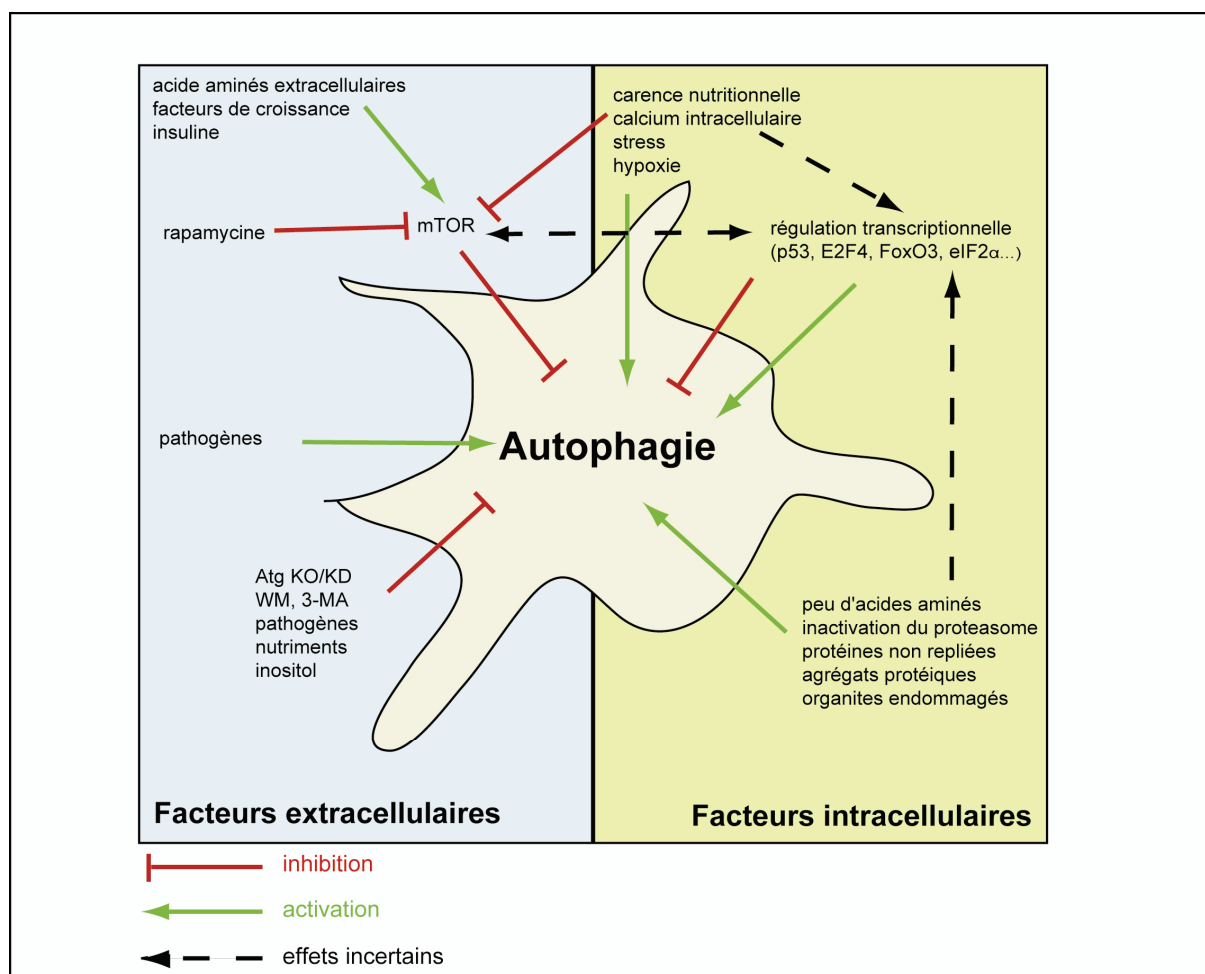


Figure 17 : Régulation du processus d'autophagie par des facteurs intracellulaires et extracellulaires. 3-MA : 3-MéthylAdénine ; Atg KO/KD : Autophagy related Knock Out/Knock Down ; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin ; WM : WortMannine. Modifié d'après Jaeger et collaborateurs (2009).

Des dysfonctionnements du processus d'autophagie sont associés au phénomène de vieillissement ainsi qu'à plusieurs pathologies, principalement les cancers, les maladies neurodégénératives, les myopathies, les infections microbiennes et des pathologies cardiaques ou hépatiques (Beau *et al.*, 2011 ; Mizushima *et al.*, 2008).

Chez les mammifères, le terme « autophagie » englobe, en réalité, trois formes différentes d'autophagie : la macroautophagie que nous appellerons ici autophagie, la microautophagie et la CMA (Chaperone Mediated Autophagie) qui ont pour point commun la dégradation de constituants cellulaires par les lysosomes mais dont le mécanisme d'action est différent (Klionsky *et al.*, 2007) (Figure 18).

La CMA est une réponse secondaire à une carence nutritionnelle qui implique, contrairement aux deux autres formes d'autophagie, une translocation directe des protéines cibles, assistée par des protéines chaperons, à travers la membrane lysosomale (Li *et al.*, 2011 ; Massey *et al.*, 2006). La microautophagie, processus le moins caractérisé, séquestre une partie du cytoplasme par invagination de la membrane lysosomale.

L'autophagie, mécanisme le plus répandu et le mieux décrit, se traduit par la formation d'une structure à double-membrane appelée pré-autophagosome ou phagophore, dont l'origine est actuellement inconnue, englobant une partie du cytoplasme. Une fois refermée, cette vésicule nommée autophagosome fusionne avec des lysosomes (autophagolysosomes), ce qui provoque la dégradation de son contenu par les enzymes lysosomales (Klionsky, 2007). La formation de l'autophagosome nécessite plusieurs étapes au cours desquelles interviennent différentes protéines. Ces protéines ont été isolées puis caractérisées chez la levure puis les mammifères et les gènes (plus d'une trentaine) dont elles sont issues ont été classés dans la nomenclature sous le terme d'atg (Klionsky *et al.*, 2003 ; Xie and Klionsky, 2007).

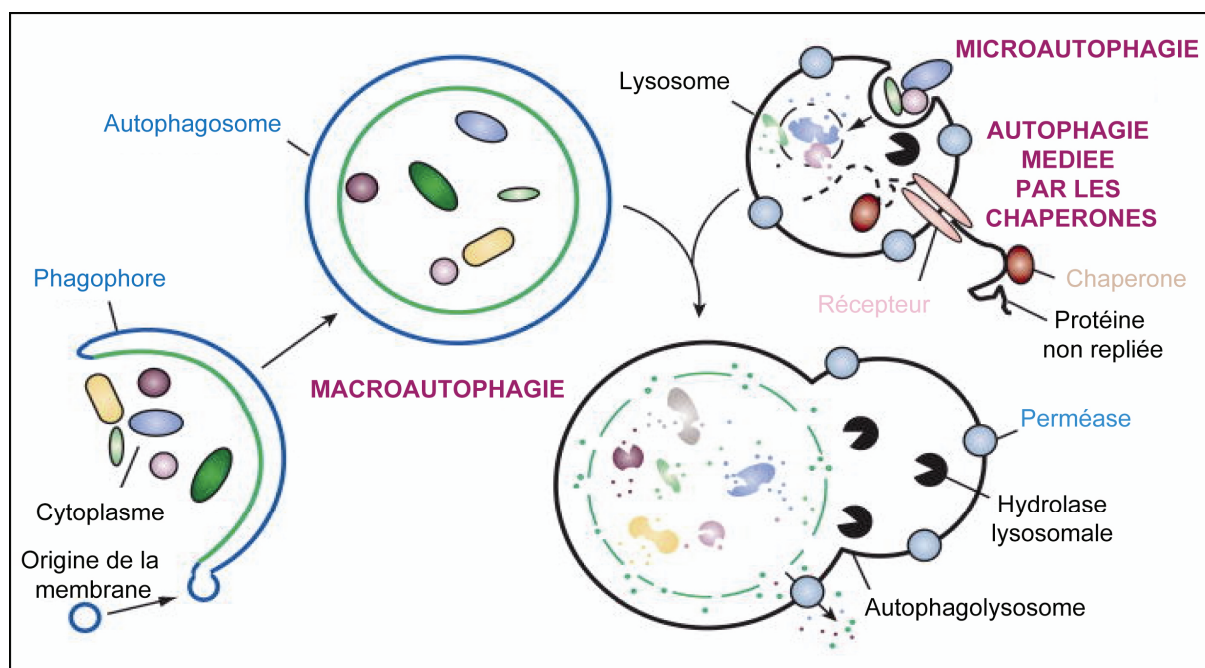


Figure 18 : Les différentes formes de l'autophagie : macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par les chaperons. Modifié d'après Mizushima et collaborateurs (2008).

Le mécanisme moléculaire d'autophagie est finement régulé et met en jeu au moins 5 complexes impliquant de nombreuses protéines. le complexe Atg1/ULK1 impliqué dans la phase d'induction et régulé par la kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), le

complexe Beclin 1/PI3K-III intervenant dans la phase de nucléation, deux protéines transmembranaires, Atg9 et VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1), deux systèmes de conjugaison mettant notamment en jeu les protéines « ubiquitin-like » Atg12 et Atg8/LC3 au cours de l'étape d'élongation, et enfin des protéines nécessaires à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yang and Klionsky, 2010)

Ces différents complexes protéiques peuvent être utilisés comme cibles de différentes molécules pour activer ou inhiber l'autophagie. Par exemple, la rapamycine active l'autophagie en inhibant mTOR et la wortmannine ou la 3-méthyladénine l'inhibe en inhibant PI3K-III (Figure 17).

Les systèmes de conjugaison de l'étape d'élongation de l'autophagosome agissent de manière similaire à ceux impliqués dans les processus d'ubiquitylation et de sumoylation (Denuc and Marfany, 2010). L'ubiquitylation met en jeu l'ubiquitine, clivée pour exposer une glycine à l'extrémité de sa partie C-terminale, ainsi que trois enzymes : E1 (enzyme d'activation), E2 (enzyme de conjugaison) et E3 (ubiquitine ligase) permettant successivement l'activation, le transfert et la liaison de l'ubiquitine à un résidu lysine de la protéine cible.

Au cours du processus d'autophagie, le premier système induit la conjugaison d'Atg12 sur Atg5 grâce aux enzymes Atg7 (équivalente à E1) et Atg10 (équivalente à E2). Le deuxième système de conjugaison implique les protéines Atg8/LC3 qui sont tout d'abord clivées par une cystéine protéase, Atg4B, pour permettre l'exposition d'un résidu glycine à leur extrémité C-terminale. La conjugaison de Atg8/LC3 sur un phospholipide, généralement une phosphatidyléthanolamine (PE), est réalisée par les enzymes Atg7 (équivalente à E1), Atg3 (équivalente à E2) et par le complexe Atg12/Atg5 (équivalent à E3). De plus, la protéine Atg5 liée à Atg12 interagit avec Atg16 qui s'homo-oligomérisse, d'où la formation d'un complexe multiprotéique (Geng and Klionsky, 2008). Ainsi modifiée, Atg8/LC3 s'associe aux autophagosomes naissants des deux côtés de la double-membrane lipidique pour être ensuite soit recyclée par rupture de sa liaison au PE grâce à l'enzyme Atg4B, soit dégradée par les enzymes lysosomales (Figure 19).

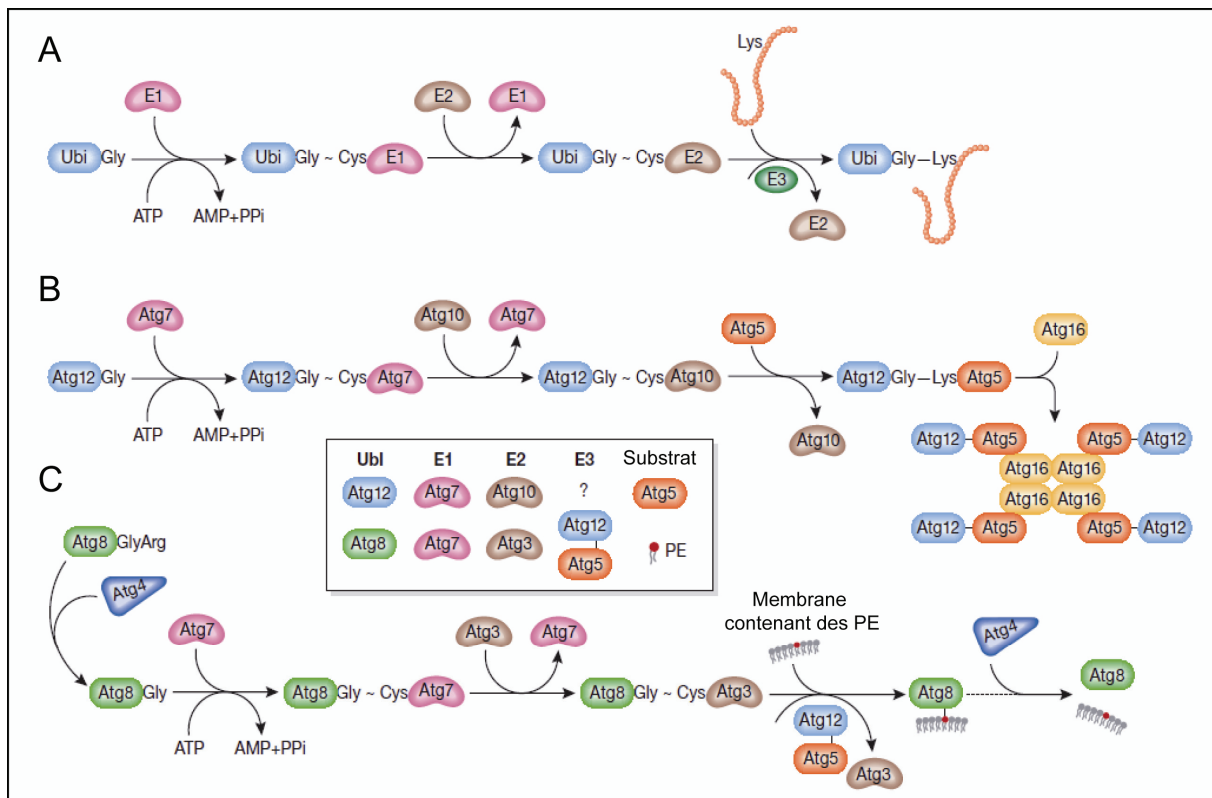


Figure 19 : Comparaison de la conjugaison des protéines Atg12 (B) et Atg8 (C) au processus d'ubiquitinylation (A) chez la levure. Atg : Autophagy-related ; PE : PhosphatidylEthanoline ; PPi : PyroPhosphate inorganique; Ubi : Ubiquitin ; Ubl : Ubiquitin-like. Modifié d'après Geng et collaborateurs (2008).

Bien que LC3 soit, chez les mammifères, l'homologue de GABARAPL1 le plus étudié et le mieux caractérisé dans le processus autophagique, des études récentes ont attribué un rôle similaire aux protéines GABARAP et GATE-16. En effet, ces deux protéines peuvent être clivées par Atg4B (et Atg4A pour GATE-16), en aval de leur résidu Gly¹¹⁶, peuvent subir une conjugaison au PE similaire à celle de LC3 et peuvent se localiser au niveau des autophagosomes (Hemelaar *et al.*, 2003 ; Kabeya *et al.*, 2004 ; Tanida *et al.*, 2002 ; Tanida *et al.*, 2001). Les protéines LC3, GABARAP et GATE-16 clivées sont appelées LC3-I, GABARAP-I et GATE-16-I, puis une fois associées aux autophagosomes, elles sont dénommées LC3-II, GABARAP-II et GATE-16-II (Figure 20). Cependant, alors que LC3 est nécessaire au niveau de l'étape de l'élongation du phagophore, GABARAP et GATE-16 participeraient plutôt aux stades plus tardifs de l'évolution du phagophore (comme sa fermeture) (Weidberg *et al.*, 2010).

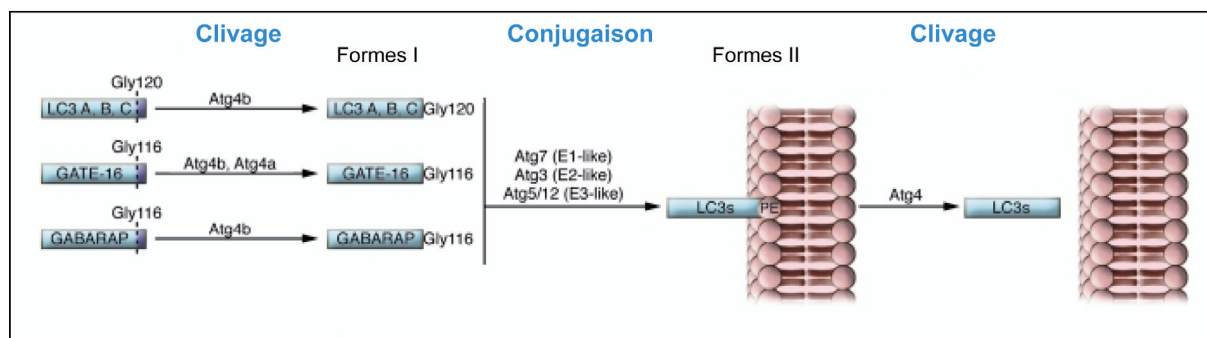


Figure 20 : Clivage des protéines homologues LC3A, LC3B, LC3C, GATE-16 et GABARAP par l'enzyme Atg4 avant et après conjugaison aux phospholipides. Atg : Autophagy-related ; LC3s : LC3A, LC3B, LC3C, GATE-16 et GABARAP ; PE : PhosphatidylEthanolamine. Modifié d'après Till et collaborateurs (2010).

Le mécanisme d'autophagie est généralement décrit comme un processus non sélectif mais une certaine sélectivité, généralement dépendante de l'ubiquitine, des pathogènes, des agrégats protéiques et des organites comme les peroxysomes ou les mitochondries a été récemment mise en évidence. Ces substrats, destinés à être dégradés par autophagie, sont pris en charge par des protéines adaptatrices telles que p62, NBR1 [Neighbour of BRCA1 (BRCA1 Cancer 1)] ou Nix, dirigés au niveau des autophagosomes en formation où ces protéines adaptatrices entrent en interaction avec les protéines Atg8, LC3, GABARAP ou GATE-16 (Johansen and Lamark, 2011 ; Kirkin *et al.*, 2009c) (Figure 21).

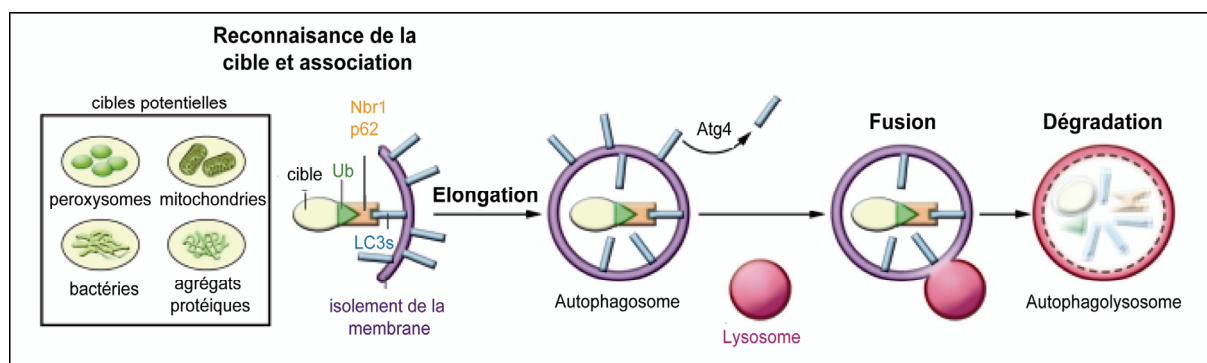


Figure 21 : Mécanisme de dégradation sélective par autophagie de peroxysomes, mitochondries, bactéries ou agrégats protéiques ubiquitinyllés impliquant les protéines adaptatrices NBR1 et p62. Atg : Autophagy-related ; LC3s : LC3A, LC3B, LC3C, GATE-16 et GABARAP ; Ub : Ubiquitin. Modifié d'après Till et collaborateurs (2010).

✓ GABARAPL1 et les protéines p62/SQSTM1 (SeQueSTosoMe 1) et NBR1

La protéine p62 appelée aussi SQSTM1 est, au niveau cellulaire, localisée dans des corps d'inclusion contenant des agrégats de protéines polyubiquitinylées, en particulier dans le

cerveau de personnes atteintes de maladies neurodégénératives et dans le foie de personnes atteintes de protéinopathies (Kuusisto *et al.*, 2001 ; Strnad *et al.*, 2008). Le gène *Nbr1* a été initialement découvert dans un carcinome ovarien comme étant un gène voisin du gène *Brcal* sur le chromosome 17 (Campbell *et al.*, 1994). Peu d'études concernant la protéine NBR1 ont été menées jusqu'à ces dernières années. Les protéines p62 et NBR1 se lient aux protéines ubiquitinylées par leur domaine UBA (Ubiquitin-Associated Domain) en position C-terminale (Kirkin *et al.*, 2009b ; Vadlamudi *et al.*, 1996). Par ailleurs, ces protéines sont actuellement considérées comme des récepteurs autophagiques jouant un rôle dans le processus d'autophagie sélective du fait de leur association à GABARAPL1 et aux autres protéines de la famille Atg8 par leurs domaines LIR (LC3-Interacting Region) de motif WXXL (Kirkin *et al.*, 2009a ; Kirkin *et al.*, 2009b ; Pankiv *et al.*, 2007 ; Rual *et al.*, 2005) (Figure 22).

✓ GABARAPL1 et Nix/BNIP3L (BCL-2 and adenovirus E1B 19 kDa-interacting Protein 3-Like)

Nix, aussi nommée BNIP3L, est une protéine pro-apoptotique principalement localisée au niveau des mitochondries qui appartient à la famille des protéines BCL-2 de par la présence d'un domaine BH3 (BCL-2 Homology 3) dans sa séquence (Chen *et al.*, 1999). Nix peut se lier à BCL-XL (B-Cell Lymphoma-eXtra Large) et BCL-2 (Imazu *et al.*, 1999). Nix est impliquée dans les cancers et dans la dégradation de mitochondries endommagées par mitophagie (Zhang and Ney, 2009). Nix peut s'associer directement à GABARAPL1 et avec les autres membres de la famille Atg8 et cette association pourrait engager un des deux domaines LIR contenus dans la séquence protéique de Nix (Novak *et al.*, 2010 ; Schwarten *et al.*, 2009) (Figure 22). Parmi les membres de cette famille, seule GABARAPL1 a été décrite comme pouvant être recrutée par Nix au niveau de la mitochondrie, suite à un traitement des cellules MEF par l'agent découplant CCCP (Carbonyl Cyanide m-Chloro-Phenyl hydrazone), permettant de suggérer un rôle de GABARAPL1 dans le processus de mitophagie.

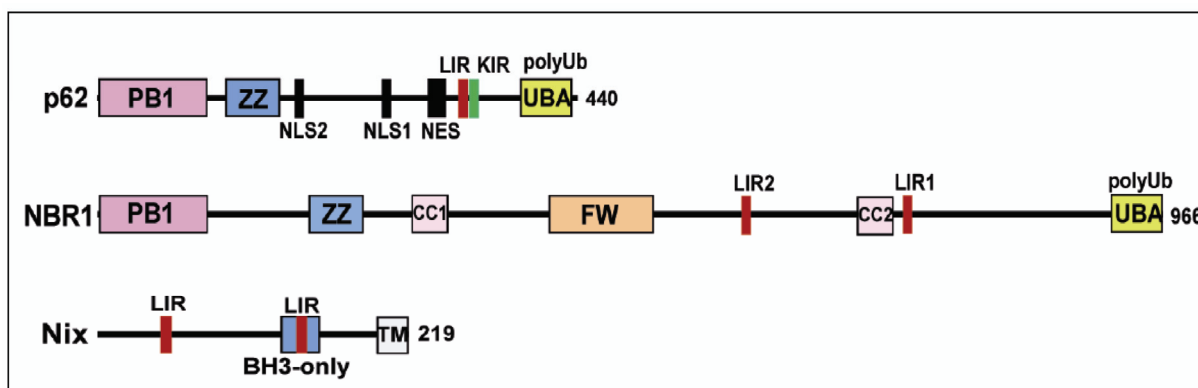


Figure 22 : Organisation structurale des domaines des protéines autophagiques p62, NBR1 (Neighbour of BRCA1) et Nix impliquées dans des processus d'autophagie sélective par interaction de leur domaine LIR (LC3-interacting region) avec les protéines de la famille Atg8. CC : Coiled-Coil domain ; FW : Four W (tryptophan) ; KIR : Keap1-Interacting Region ; NES : Nuclear Export Signal ; NLS : Nuclear Localization Signal ; PB1 : Phox and Bem1 domain ; TM : TransMembrane domain ; UBA : UBiquitin-Associated domain ; ZZ : zinc finger domain. Modifié d'après Johansen et collaborateurs (2011).

✓ GABARAPL1 et Stbd1 (Starch binding domain1/généthoine 1)

La protéine Stbd1 est une protéine peu étudiée à ce jour et majoritairement exprimée dans le foie et le muscle, sites majeurs de stockage de l'énergie sous forme de glycogène. Jiang et collaborateurs ont récemment rapporté l'interaction *in vitro* de Stbd1 avec des polysides tels que l'amylopectine et le glycogène par l'intermédiaire du domaine CBM20 (Carbohydrate Binding Domain 20) ainsi qu'avec les protéines GABARAPL1 et GABARAP, par double-hybride chez la levure et par immunoprécipitation dans les cellules COS M9 (Jiang *et al.*, 2010b). De plus GABARAPL1 et Stbd1 co-localisent de manière plus importante que GABARAP et Stbd1 dans la région périnucléaire de ces cellules. Les auteurs ont émis l'hypothèse que GABARAPL1 favoriserait l'élimination du glycogène par autophagie *via* son association avec Stbd1.

GABARAPL1, de par son appartenance à la famille Atg8 et de par son interaction avec les protéines adaptatrices p62, NBR1 et Nix (Kirkin *et al.*, 2009b ; Novak *et al.*, 2010 ; Pankiv *et al.*, 2007 ; Rual *et al.*, 2005), pourrait constituer une nouvelle protéine du processus autophagique, l'impliquant ainsi probablement dans diverses pathologies comme les cancers ou les maladies neurodégénératives.

Du fait de la forte homologie de séquence et de structure entre GABARAPL1 et les autres membres de la famille Atg8, on peut présumer de l'interaction de GABARAPL1 avec des protéines déjà connues pour s'associer à un ou plusieurs de ces membres. En particulier, GABARAPL1 s'associe très probablement avec les protéines ULK-1 et TP53INP2 (Tumour Protein 53 Induced Nuclear Protein 2), connues pour interagir avec GABARAP, GATE-16 et LC3 et impliquées dans le processus d'autophagie. De plus, une étude qui avait pour but d'identifier les partenaires des protéines autophagiques par immunoprécipitation dans des cellules HEK293, a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines s'associant à GABARAPL1 dont des partenaires déjà connus comme p62, NBR1 et la tubuline (Behrends *et al.*, 2010). Cependant, ni la confirmation de ces interactions *in vivo*, ni leur implication fonctionnelle n'a été recherchée par la suite.

3 LES CANCERS DU SEIN

3.1 Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent à travers le monde avec environ 1,3 millions de nouveaux cas détectés chaque année dont 50 000 estimés en France depuis une décennie. L'incidence du cancer du sein augmente de façon importante depuis 25 ans en Europe (Botha *et al.*, 2003) et ce type de cancer représentait 13,3% des cas de cancer en 2004 et est à l'origine d'environ 20% des décès par cancer chez la femme (Belot *et al.*, 2008 ; Boyle and Ferlay, 2005 ; Ferlay *et al.*, 2007).

3.2 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque, environnementaux, génétiques et comportementaux, sont connus comme favorisant l'émergence des cancers du sein (Clamp *et al.*, 2003 ; Falkenberry and Legare, 2002 ; Korde *et al.*, 2004). Le cancer du sein concerne majoritairement les femmes puisque seulement 1% des hommes présentent cette pathologie. Pour autant, le pronostic vital leur est plus défavorable, le diagnostic étant établi plus tardivement. Le vieillissement est fortement lié à l'apparition du cancer du sein. En effet, il est rare avant 40 ans (10%) mais beaucoup plus fréquent à partir de 50 ans (75%). Parmi les cancers du sein, seulement 5 à 10% sont associés à des facteurs d'origine génétique ; on parle de formes héréditaires ou familiales opposées aux formes sporadiques ou non familiales beaucoup plus répandues. Cette prédisposition génétique est principalement due à des mutations, en particulier des gènes BRCA1, BRCA2 et p53 augmentant considérablement le risque de

développement d'un cancer du sein (Wooster *et al.*, 1994). Néanmoins, ces mutations sont rares et ne représentent qu'une faible partie de l'ensemble de mortalité par cancer du sein. Les femmes ayant subi une exposition prolongée à des estrogènes d'origine endogène, suite à une puberté précoce (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans) ou une première grossesse tardive (après 30 ans) ou d'origine exogène suite à l'utilisation de contraceptifs oraux ou d'un traitement hormonal substitutif présentent également un risque plus élevé. Parmi ces nombreux facteurs, figurent également des facteurs environnementaux comme les polluants et les perturbateurs endocriniens ainsi que des facteurs comportementaux tels que l'obésité et la consommation excessive d'alcool ou de tabac (Danaei *et al.*, 2005 ; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Enfin, des mastopathies, terme faisant référence à des anomalies du sein souvent bénignes, peuvent accroître le risque de développer un cancer du sein.

3.3 Origine cellulaire des tumeurs

La grande majorité des cancers du sein (95%) sont des adénocarcinomes se développant à partir des cellules épithéliales des canaux et lobules de la glande mammaire, au niveau des Unités Terminales Ductulo-Lobulaires. En fonction de la topographie de la tumeur, on distingue ainsi des cancers canaux, représentant 80% des tumeurs, et des cancers lobulaires qui prennent naissance à partir des canaux et des lobules respectivement. Lorsque les cellules tumorales restent confinées à l'intérieur d'un canal ou d'un lobule, la lésion est qualifiée d'*in situ* (Burstein *et al.*, 2004). En revanche, lorsqu'elles s'infiltrant, à un stade plus avancé, au-delà du canal ou du lobule par rupture de leur membrane basale, la lésion est qualifiée d'invasive ou infiltrante. Dans ce cas, les cellules tumorales peuvent alors gagner les vaisseaux lymphatiques et sanguins entraînant, par conséquent, la formation de métastases dans différents organes tels que le foie, les poumons, les os ou le cerveau (Polyak, 2007). Les ganglions du lymphocentre axillaire, localisés au niveau de l'aisselle, sont responsables du drainage de 75% de la lymphe du sein. Parmi les carcinomes infiltrants, de nombreux types, autres que les carcinomes lobulaires ou canaux, existent tels que les carcinomes mucineux, médullaires ou papillaires qui présentent des caractéristiques spécifiques. De plus, la maladie de Paget du mamelon est une forme particulière de cancer du sein caractérisée par une ulcération du mamelon généralement associée à un carcinome mammaire sous-jacent pouvant être de type infiltrant ou canalaire *in situ*.

D'autres tumeurs beaucoup moins fréquentes (5%), telles que la tumeur phyllode ou le fibroadénome prennent naissance au niveau du tissu conjonctif intralobulaire.

3.4 Classification

3.4.1 Classification histologique

La classification histologique des cancers du sein a été effectuée en 1981, puis a été mise à jour en 2003, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Bocker, 2002 ; Dupont and Page, 1985). En réalité, deux types de classification histologique sont actuellement en vigueur et ne se différencient que par l'appellation des lésions pré-invasives et carcinomes *in situ*. La classification traditionnelle, encore beaucoup utilisée par les anatomopathologistes, est basée sur la distinction de trois types de lésions, les hyperplasies (simples et atypiques), les carcinomes *in situ* et les carcinomes infiltrants ou invasifs, évoluant selon un *continuum* (Polyak, 2007) (Figure 23). Cette « théorie de progression linéaire » est actuellement controversée du fait de la grande hétérogénéité histologique et moléculaire des cancers du sein. Plusieurs études supportent en effet l'existence d'une seconde théorie selon laquelle les carcinomes canauxaux *in situ* de bas grade évolueraient directement en carcinomes canauxaux infiltrants de bas grade et les carcinomes *in situ* de haut grade en carcinomes canauxaux infiltrants de haut grade (Wiechmann and Kuerer, 2008).

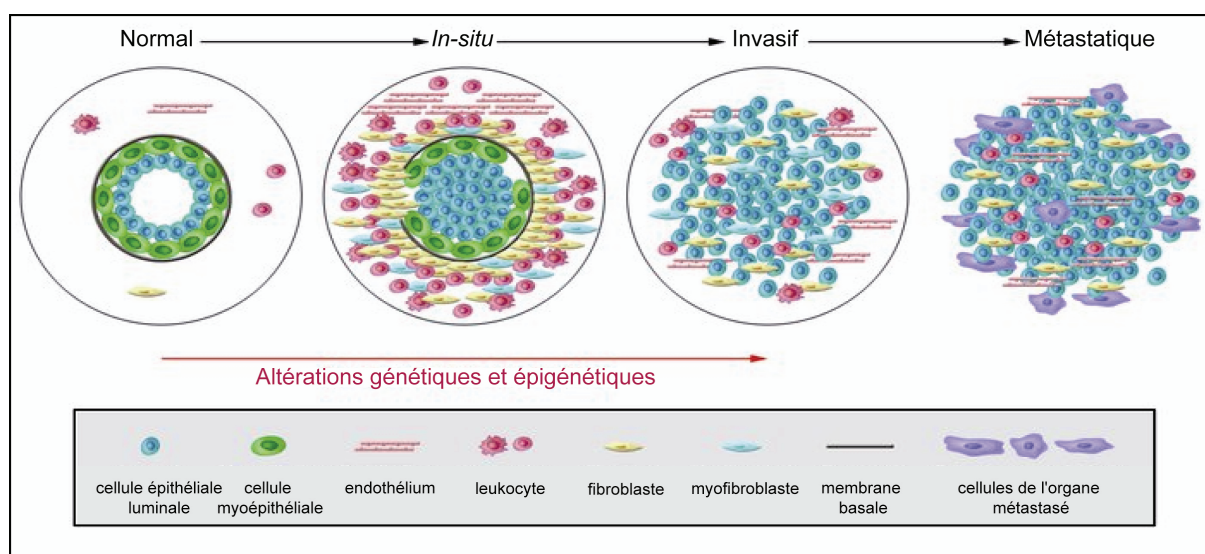


Figure 23 : Modèle hypothétique de la tumorigenèse mammaire. Les différentes étapes de la progression d'un carcinome canalaire de sein sont représentées. Les canaux normaux sont composés d'une membrane basale et d'une couche de cellules luminales et myoépithéliales. Les cellules du stroma regroupent des leucocytes, des fibroblastes, des myofibroblastes et des cellules endothéliales. Dans le cas de carcinomes *in situ*, les cellules myoépithéliales sont altérées au niveau génétique et épigénétique et leur nombre décroît. En même temps, le nombre de fibroblastes, de myofibroblastes, de leucocytes et de cellules endothéliales augmente. La diminution du nombre de cellules myoépithéliales et la rupture de la membrane basale sont caractéristiques du carcinome invasif. Dans ce cas, les cellules tumorales peuvent envahir les tissus voisins et peuvent migrer au niveau d'organes plus distants pour former des métastases. Modifié d'après Polyak et collaborateurs (2007).

Dans la nouvelle terminologie, dite LIN (Lobular Intraepithelial Neoplasia) /DIN (Ductal Intraepithelial Neoplasia), les lésions lobulaires sont divisées en trois grades LIN et les hyperplasies canalaire atypiques et les carcinomes canalaire *in situ* sont regroupés en trois grades DIN. Les carcinomes infiltrants conservent leur appellation et de nombreux types existent en fonction de leur aspect cytologique. Ainsi, les proliférations épithéliales canalaire sont divisées en six catégories et les proliférations lobulaires en quatre catégories (Tableau III, Tableau IV).

TERMINOLOGIE TRADITIONNELLE	NEOPLASIE INTRA-EPITHELIALE DE TYPE LOBULAIRE
Hyperplasie lobulaire atypique	LIN-1
Hyperplasie lobulaire atypique/Carcinome lobulaire <i>in situ</i>	LIN-2
Carcinome lobulaire <i>in situ</i>	LIN-3
Carcinome lobulaire infiltrant	Carcinome lobulaire infiltrant

Tableau III : Classification histologique des cancers du sein d'origine lobulaire selon l'OMS. LIN : Lobular Intraepithelial Neoplasia. Dans la classification LIN, les chiffres indiquent le grade.

TERMINOLOGIE TRADITIONNELLE	NEOPLASIE INTRA-EPITHELIALE DE TYPE CANALAIRE
Hyperplasie canalaire simple	DIN-1A
Hyperplasie canalaire atypique	DIN-1B
Carcinome canalaire <i>in situ</i> de bas grade	DIN-1C
Carcinome canalaire <i>in situ</i> de grade intermédiaire	DIN-2
Carcinome canalaire <i>in situ</i> de haut grade	DIN-3
Carcinome canalaire infiltrant	Carcinome canalaire infiltrant

Tableau IV : Classification histologique des cancers du sein d'origine canalaire selon l'OMS. DIN : Ductal Intraepithelial Neoplasia. Dans la classification DIN, les chiffres indiquent le grade.

Par ailleurs, il est à noter que ces classifications ne considèrent que les adénocarcinomes et non les tumeurs prenant leur origine hors de l'épithélium mammaire. De nouvelles classifications sont régulièrement proposées du fait de l'évolution continue des techniques utilisées par les anatomopathologistes. Cependant, ce type de classification est pris en défaut dans un certain nombre de cas, ce qui est source de surtraitements ou de traitements inappropriés. Une classification moléculaire, basée sur l'étude des altérations génomiques, est par conséquent essentielle pour affiner le diagnostic et ainsi améliorer la prise en charge des malades.

3.4.2 Classification moléculaire

Grâce aux nouvelles techniques d'analyse génomique, notamment les puces à ADN, une classification moléculaire des cancers du sein a pu être établie en fonction de l'expression spécifique de certains gènes. Les marqueurs moléculaires les mieux caractérisés et les plus fiables sont les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone et la protéine HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) appelée aussi ErbB2. Il existe cinq sous-types moléculaires de cancers du sein: luminaux A et B, le sous-type basal, HER2, et normal (Perou *et al.*, 2000 ; Sorlie, 2007 ; Sorlie *et al.*, 2001 ; Sorlie *et al.*, 2003). Les tumeurs classées dans ces différents sous-types se différencient essentiellement par leurs origines cellulaires, leurs phénotypes, leurs pronostics et leurs réponses au traitement (Tableau V). Certains cancers du sein, ne pouvant toutefois pas être classés dans ces sous-types, nécessitent une caractérisation plus précise. Des associations entre sous-types moléculaires et certains types histologiques ont pu être démontrées. Par exemple, les cancers lobulaires appartiennent majoritairement aux sous-types luminal et normal (Korkola *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2004), alors que les cancers médullaires sont exclusivement de sous-type basal (Bertucci *et al.*, 2006).

Sous-types	Fréquence	Origine cellulaire	Principales caractéristiques phénotypiques	Pronostic	Réponse au traitement	Particularité
luminaux A et B	60 à 70%	cellules épithéliales de la lumière des canaux et lobules	RE+ et/ou RP+, HER2- (luminal A)/HER2+ (luminal B) GATA-3+ cytotkératines 8+, 18+, 19+	favorable	meilleure réponse à l'hormonothérapie pour le sous-type A car plus forte expression du RE	
basal	10 à 20%	cellules myoépithéliales (basales)	RE-, RP-, HER2- (tumeurs triple-négatives) cytotkératines 5+, 6+, 14+, 17+ EGFR+ c-kit+	très défavorable	- aucune réponse à l'hormonothérapie ou aux thérapies dirigées contre HER2 - sensible à la chimiothérapie à haute dose	- souvent muté pour p53 - englobe la plupart des tumeurs altérées pour la voie BRCA1
HER2	7 à 15%	non déterminée	HER2+ cytotkératines 8+, 18+, 19+	défavorable	plus ou moins sensible aux thérapies dirigées contre HER2	souvent muté pour p53
normal	10 à 20%	non déterminée	phénotype le plus proche du tissu normal	intermédiaire	variable	

Tableau V : Principales caractéristiques des différents sous-types moléculaires de cancer du sein. BRCA1 : BReast CAncer 1 ; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor ; HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2 ; RE : Récepteur aux Estrogènes ; RP : Récepteur à la Progestérone. D'après Perou et collaborateurs (2000), Sorlie et collaborateurs (2001, 2003, 2006), Rahka et collaborateurs (2007), Nielsen et collaborateurs (2004), Livasy et collaborateurs (2006), Bertucci et collaborateurs (2004), Turner et collaborateurs (2007), Arnes et collaborateurs (2005), Ross et collaborateurs (2003).

La classification moléculaire des cancers du sein est en constante évolution étant donné le nombre croissant d'études visant à identifier de nouveaux marqueurs spécifiques des divers sous-types.

Actuellement, les deux types de classification, histologique et moléculaire, sont utilisés par les oncologues pour permettre une meilleure caractérisation des tumeurs de sein et, par conséquent, pour proposer une thérapie plus adaptée et accroître les chances de survie des patients.

3.5 Facteurs pronostiques et prédictifs influençant le choix d'un traitement

Le traitement du cancer du sein fait appel à plusieurs stratégies thérapeutiques dont le choix est dépendant de facteurs à la fois pronostiques et prédictifs. Les facteurs pronostiques évaluent l'évolution spontanée de la maladie indépendamment de l'effet d'un traitement alors que les facteurs prédictifs cherchent à prévoir l'efficacité d'un traitement. Les stratégies thérapeutiques actuelles sont: la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et des thérapies ciblées comme l'hormonothérapie ou l'immunothérapie.

3.5.1 Les facteurs pronostiques

- **Les données cliniques et la classification TNM (Tumor Node Metastasis)**

Ces données sont prises en compte lors du diagnostic et se basent sur des facteurs cliniques personnels, tels que l'âge, les antécédents familiaux, les habitudes de vie (pratique de sport, habitudes alimentaires) ainsi que sur des facteurs anatomiques de la tumeur déterminés par la classification TNM. Cette classification est un système international, proposé par le chirurgien français Pierre Denoix de l'Institut Gustave-Roussy entre 1943 et 1952, dans le but d'établir un classement des cancers d'origine épithéliale (carcinomes) selon leur extension anatomique. Plusieurs révisions, entreprises par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), ont depuis été publiées, la dernière étant la septième édition en 2009 (Sobin and Compton, 2010) (Tableau VI). Les trois lettres T, N et M décrivent la propagation du cancer respectivement sur le site de la tumeur primaire par description de la taille de la tumeur, dans les ganglions lymphatiques à proximité de la tumeur, et à distance coïncidant avec la présence d'éventuelles métastases. Chaque lettre est affectée d'un coefficient selon le niveau d'extension. Dans son principe, cette classification considère uniquement les données cliniques établies au moment du diagnostic et ne s'applique qu'à des cancers qui n'ont pas encore été traités ; on parle de statut TNM clinique (cTNM ou TNM). Cependant on distingue désormais un statut TNM pathologique (pTNM) obtenu suite à une exploration chirurgicale, renseignant plus précisément sur l'extension de la tumeur.

Tumeurs primitives (T)	
T_x	Détermination de la tumeur primitive impossible
T₀	Pas de signe de tumeur primitive
T_{is}	Carcinome <i>in situ</i> : carcinome intracanalair <i>in situ</i> ou carcinome lobulaire <i>in situ</i> , ou maladie de Paget du mamelon (Paget) sans tumeur décelable
T₁	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension : ≤ 0,1 cm (micro-invasion, mic) ; > 0,1 cm et ≤ 0,5 cm (T1a) ; > 0,5 cm et ≤ 1 cm dans (T1b) ; > 1 cm et ≤ 2 cm (T1c)
T₂	Tumeur > 2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T₃	Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension
T₄	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (T4a), à la peau (T4b), aux deux (T4c) ou de type inflammatoire (T4d)
Adénopathies régionales (N) (détectées à l'examen clinique ou radiologique)	
N_x	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire (du fait, par exemple, d'une exérèse antérieure)
N₀	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
N₁	Ganglions axillaires homolatéraux mobiles
N₂	Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures
N₃	Ganglions mammaires internes homolatéraux
Adénopathies régionales (étude anatomopathologique pN)	
pN_x	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire (absence d'exérèse ou exérèse antérieure)
pN₀	Pas d'adénopathie régionale métastatique
pN₁	Adénopathie(s) métastatique(s) régionale(s) axillaire(s) homolatérale(s) mobile(s) pN1a : Présence uniquement de micrométastases (≤ 0,2 cm) pN1b : Adénopathie(s) métastatique(s) > 0,2 cm pN1bi : Métastases atteignant 1 à 3 ganglions, > 0,2 cm et < 2 cm dans leur plus grande dimension pN1bii : Métastases atteignant 4 ganglions ou plus, > 0,2 cm et < 2 cm dans leur plus grande dimension pN1biii : Extension métastatique extra capsulaire < 2 cm dans sa plus grande dimension pN1biv : Métastase ganglionnaire ≥ 2 cm dans sa plus grande dimension
pN₂	Adénopathie(s) métastatique(s) régionale(s) axillaire(s), homolatérale(s) fixée(s) entre elle(s) ou à d'autres structures
pN₃	Adénopathie(s) métastatique(s) régionale(s) mammaire(s) interne(s) homolatérale(s)
Métastases à distance (M)	
M_x	Détermination impossible de l'extension métastatique
M₀	Absence de métastases à distance
M₁	Présence de métastase(s) à distance

Tableau VI : Classification TNM établie par l'UICC en 1997 (5^{ème} édition).

Une classification par stades (0, I, II, III, IV) basée sur celle TNM mais moins informative et essentiellement utilisée par les anglo-saxons, est également en vigueur. Le stade tumoral regroupe donc les différents paramètres pris en compte par la classification TNM. Le stade 0 correspond à un cancer *in situ*, le stade I à un cancer localisé et dont la tumeur est de petite taille, le stade II à un cancer localisé dont la tumeur peut être de grande taille et accompagné d'un risque élevé de dissémination métastatique, le stade III à un cancer avec généralement envahissement ganglionnaire et le stade IV à un cancer métastatique

Tableau VII.

Stades		Classification TNM
0		Tis N0 M0
I		T1 N0 M0
II	II A	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0
	II B	T2 N1 M0 T3 N0 M0
III	III A	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1/N2 M0
	III B	T4 N0/N1/N2 M0
	III C	Tout T, N3 M0
IV		Tout T, tout N M1

Tableau VII : Les différents stades tumoraux et la classification TNM associée.

- **Les données histologiques et le grade SBR (Scarff, Bloom et Richardson)**

Les informations permettant de classer une tumeur dans un certain type histologique sont fournies par une analyse anatomopathologique de la tumeur suite à une biopsie et suite à une opération chirurgicale. Ces données peuvent être par ailleurs complétées par un grade histopronostique ou SBR, réalisé sur tous les types histologiques de cancer infiltrant sauf le carcinome médullaire. La définition du grade histopronostique de la tumeur est basée sur les caractéristiques des cellules tumorales et leur relation entre elles. Le grade est déterminé suite au calcul d'un score lui-même obtenu par l'addition de trois critères basés sur la différenciation architecturale de la tumeur, le degré d'anomalie nucléaire et l'activité mitotique. Le grade SBR comprend donc trois niveaux de grades : I (bas grade), II (grade modéré) et III (haut grade) corrélés à la croissance et au risque de propagation de la tumeur. Ainsi, plus le grade est élevé, moins le pronostic est favorable et inversement. Il existe en effet une différence pronostique marquée entre le grade I et les grades II et III avec 20 à 35% supplémentaires de gain de survie à dix ans pour les grades I.

3.5.2 Les facteurs prédictifs

Certains facteurs permettent de prédire la sensibilité du cancer à certains types de traitements, en particulier les thérapies ciblées. Dans le cancer du sein, il en existe actuellement deux. Ce sont le statut d'expression des récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes et récepteurs à la progestérone) et le statut d'expression à la surface de la cellule de la protéine HER2 qui permettent de prédire l'efficacité d'un traitement anti-hormonal ou d'un traitement ciblant HER2 respectivement. Dans environ deux tiers des cancers du sein, les cellules cancéreuses présentent des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. La tumeur est alors dite hormono-sensible car les œstrogènes stimulent la prolifération cancéreuse par l'intermédiaire de ces récepteurs. Les traitements hormonaux agiront soit en diminuant le taux d'œstrogènes circulant et donc la stimulation des récepteurs, soit en bloquant leur fixation aux récepteurs grâce à des antagonistes comme le tamoxifène. Dans le cas des traitements ciblant HER2, deux approches existent : d'une part, l'immunothérapie qui consiste en l'utilisation d'anticorps se fixant à HER2 et empêchant donc la fixation d'un ligand activant le récepteur et d'autre part, l'utilisation de molécules inhibant l'activité tyrosine kinase de HER2. Ces différents traitements sont généralement proposés en association avec de la chimiothérapie ou la radiothérapie.

Les facteurs pronostiques prévoyant le risque de récurrence du cancer du sein et donc la survie des patients et les facteurs prédictifs déterminant la réponse aux traitements sont étroitement liés. La découverte de nouveaux marqueurs moléculaires des différents types de cancers du sein se révèle nécessaire de manière à pouvoir affiner le pronostic vital et à s'orienter vers la stratégie thérapeutique la plus appropriée.

*MATERIELS ET
METHODES*

1 MODELES ANIMAUX

Les rats Sprague-Dawley (Charles Rivers, France) et les souris « nude » (Janvier, France) sont élevés à l'animalerie de l'IBCT (Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire) dans des conditions contrôlées : température constante à 21°C, cycle d'éclairage : 12 heures de lumière/ 12 heures d'obscurité, accès à une alimentation standard et à l'eau à volonté et dans des conditions stériles pour les souris « nude ».

1.1 Méthode de fixation des cerveaux de rat

Les cerveaux de rats ont été fixés par perfusion intracardiaque. Les rats ont été anesthésiés de la même manière que précédemment. La cage thoracique a été ensuite ouverte, le cœur dégagé et le ventricule gauche ainsi que l'oreillette droite ont été fendus. Une canule a alors été introduite par le ventricule jusqu'à l'aorte ascendante et le réseau vasculaire de l'animal a été rincé, à l'aide d'une pompe, par perfusion de 150 ml d'une solution de NaCl 0,9%. Les tissus nerveux ont ensuite été fixés par 150 ml d'une solution de PFA (ParaFormaldéhyde) 4%. Le cerveau est alors retiré de la boîte crânienne du rat et post-fixé dans le même fixateur à 4°C pendant 24h.

1.2 Coupes de cerveaux de rat

Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'hydrate de chloral 7% à la dose létale de 1 mg pour 200 g de masse corporelle. Ils sont ensuite perfusés en intra-cardiaque avec une solution de 0,9% NaCl. Le liquide de perfusion est ensuite remplacé par du PBS-PFA (150 mM NaCl, 10 mM phosphate de Na, pH 7,4-1% PFA) et qui assure déjà une fixation des tissus. Le cerveau est alors retiré de la boîte crânienne du rat et post-fixé dans le même fixateur pendant 12 h à 4°C, puis « cryoprotégés » par un bain de PBS-sucrose 15% pendant une nuit à 4°C et enfin congelés sur vapeurs d'azote. Les cerveaux sont alors coupés à -20°C à l'aide d'un cryostat. Les coupes, d'une épaisseur de 10 µm, sont récupérées sur des lames gélatinées au laboratoire et stockées à -40°C.

2 MATÉRIELS BIOLOGIQUES

2.1 Vecteurs plasmidiques

2.1.1 Vecteur pGEM-T easy

Le vecteur pGEM-T easy (Promega) est utilisé pour le clonage des produits de PCR dont certains possèdent à leur extrémité des désoxyadénylates. Ce vecteur linéaire présente en effet des résidus désoxythymidylates aux extrémités 3'OH permettant la ligature directe des produits de PCR. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline.

2.1.2 Vecteurs pSBet flag-gabarapl1-6his et pSBet flag-gabarap-6his

Le vecteur pSBet (Schenk *et al.*, 1995) est un vecteur d'expression procaryote contenant un promoteur sous contrôle de l'ARN polymérase T7, un gène de résistance à la kanamycine et le gène *argU* codant l'ARNt^{Arg} (AGA/AGG) d'*Escherichia coli* permettant un haut niveau d'expression protéique chez la bactérie (Dieci *et al.*, 2000). Le plasmide pSBet dont nous disposons (gracieusement fourni par le Dr. Boyer-Guittaut) contient des séquences supplémentaires codant l'épitope Flag (composé de 8 résidus DYKDDDDK) et l'épitope 6his (composé de 6 résidus histidine).

Après un clonage intermédiaire dans le vecteur pGEM-T easy, des inserts de 351 pb, correspondant à la partie codante de l'ADNc *gabapapl1* de cobaye et à la partie codante de l'ADNc *gabarap* humain, sont clonés dans ce plasmide, au niveau des sites de restriction *XbaI* et *BamHI/BglII* pour *gabapapl1* et *XbaI* et *BamHI* pour *gabarap*, permettant ainsi l'expression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS et de la protéine FLAG-GABARAP-6HIS dans des bactéries BL21-DE3 (Stratagène). Ces bactéries expriment l'ARN polymérase du phage T7 dont le gène est sous la dépendance d'un promoteur inductible par l'IPTG. Une purification des protéines FLAG-GABARAPL1-6HIS et FLAG-GABARAP-6HIS est réalisée par chromatographie d'affinité au nickel.

2.1.3 Vecteurs pcDNA 5/FRT flag-gabarapl1-6his et pcDNA5/FRT flag-gabarapl1-G116A-6his

Le vecteur pcDNA5/FRT (Invitrogen) contient un site FRT (Flp Recombination Target) issu de *Saccharomyces cerevisiae*, un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à l'hygromycine non. Ce vecteur est conçu pour être utilisé avec le système Flp-in

développé par la société Invitrogen et le gène de résistance à l'hygromycine est exprimé une fois le vecteur transfecté dans les cellules Fpl-in conçues pour être utilisées avec ce système.

Après un clonage intermédiaire dans le vecteur pGEM-T easy, le fragment *flag-gabarapl1-6his*, obtenu à partir du vecteur pSBet *flag-gabarapl1-6his*, est cloné dans ce vecteur au niveau des sites de restriction *NheI* et *NotI*. Des cellules Fpl-in-HEK293 sont transfectées de manière stable par le vecteur recombinant pcDNA 5/FRT *flag-gabarapl1-6his* afin de surexprimer la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans cette lignée.

Afin de créer le vecteur pcDNA5/FRT *flag-gabarapl1-G116A-6his*, la partie codante de l'ADNc *gabarapl1* est mutée à partir du vecteur pcDNA5/FRT *flag-gabarapl1-6his* par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange Site-Directed mutagenesis system (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur. L'avant-dernier codon (GGG) de la partie codante de l'ADNc *gabarapl1* codant initialement un résidu glycine est muté au niveau de la cytosine centrale pour ainsi former le codon GCG permettant la synthèse d'un résidu alanine. Ce vecteur est utilisé pour créer la lignée stable HEK293 FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS.

2.1.4 Vecteur pOG44

Le vecteur pOG44 (Invitrogen) code la Fpl recombinase issue de *Saccharomyces cerevisiae*. Il exprime un gène de résistance à l'ampicilline. Lors de la transfection des cellules Fpl-in-HEK293 par le vecteur pcDNA 5/FRT *flag-gabarapl1-6his*, une co-transfection avec le vecteur pOG44 est effectuée afin de permettre l'intégration du transgène au sein du génôme de ces cellules au niveau du site FRT.

2.1.5 Vecteurs pcDNA 3.1 *gabarapl1* et pcDNA 3.1 *flag-gabarapl1-6his*

Le plasmide pcDNA 3.1 (Invitrogen) est un vecteur d'expression eucaryote possédant les gènes de résistance à l'ampicilline et à l'hygromycine.

Le vecteur pcDNA 3.1 *gabarapl1* contient la partie codante de l'ADNc *gabarapl1*. Le vecteur pcDNA 3.1 *flag-gabarapl1-6his* possède le fragment *flag-gabarapl1-6his* suite à un sous-clonage réalisé entre les sites de restriction *NheI* et *NotI* à partir du vecteur pSBet *flag-gabarapl1-6his*. Des cellules MCF-7 sont transfectées de manière stable par le vecteur recombinant pcDNA 3.1 *flag-gabarapl1-6his* afin de surexprimer la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans cette lignée.

2.1.6 Vecteurs *pGEX-4T2-GABARAPL1*, *pGEX-4T2-GABARAPL1 (22-117)* et *pGEX-4T3-HSP90 α*

Les vecteurs pGEX-4T2 (Amherham Pharmacia) et pGEX-4T3 (Amherham Biosciences) possèdent le gène codant la GST (Gluthathion-S-Transférase) sous le contrôle du promoteur procaryote *plac* inductible par l'IPTG. Ce vecteur contient un gène de résistance à l'ampicilline. Il permet l'expression de gènes codant des protéines de fusion entre la GST et une protéine d'intérêt. Le plasmide pGEX-4T2-GABARAPL1 contenant la séquence codant la protéine GABARAPL1 et le plasmide pGEX-4T2-GABARAPL1 (22-117) contenant la séquence codant la protéine GABARAPL1 déletée des vingt-deux premiers acides aminés en position N-terminale ont été antérieurement construits au laboratoire (Mansuy *et al.*, 2004). Le plasmide pGEXT-4T3-HSP90 contient la séquence codant la protéine HSP90 α . Ce vecteur nous a été gracieusement fourni par D.C. Altieri (University of Massachusetts, Medical School, USA).

Ces différents vecteurs ont permis la synthèse des protéines recombinantes GST, GST-GABARAPL1, GST-GABARAPL1 (22-117) et GST-HSP90 α .

2.1.7 Vecteurs *pGFP-GABARAPL1*, *pGABARAPL1-GFP* et *pGFP-HSP90 β*

Les vecteurs pEGFP-C1 et pEGFP-N1 (Clontech) possèdent le gène codant la GFP en amont (pEGFP-C1) ou en aval (pEGFP-N1) du site de multi-clonage ainsi que des gènes de résistance à la kanamycine et à la néomycine. Après un clonage intermédiaire dans le vecteur pGEM-T easy, la partie codante de l'ADNc *gabarapl1* de cobaye (351 pb) est sous-clonée dans le vecteur pEGFP-C1 au niveau des sites de restriction *Bgl*III et *Eco*RI et dans le vecteur pEGFP-N3 au niveau des sites de restriction *Xho*I et *Sac*II, permettant ainsi, après transfection, l'expression des protéines GFP-GABARAPL1 et GABARAPL1-GFP dans les cellules HEK293 et MCF-7. Le vecteur pGFP-HSP90 β , contenant la séquence codant la protéine HSP90 β , nous a été gracieusement fourni par J. Kim (Korea University).

2.1.8 Vecteur *pDsred-GABARAPL1*

Le vecteur pDsred-LC3 appelé aussi pRFP-LC3 a été gracieusement fourni par J. Nowak (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Marseille). Il contient un fragment du gène *lc3* de rat cloné en aval d'une séquence codant une protéine fluorescente rouge, Dsred. Il possède un site de multi-clonage en aval du gène codant la Dsred et des gènes de résistance à la kanamycine.

La partie codante de l'ADNc *gabarapl1* de cobaye (351 pb) est sous-clonée au niveau des sites de restriction *Bgl*III et *Eco*RI à partir du vecteur pGFP-GABARAPL1 dans le vecteur pDsred, après libération du fragment du gène *lc3*. La construction pDsred-GABARAPL1 a permis l'établissement des lignées cellulaires stables HEK293 Dsred-GABARAPL1 et MCF-7 Dsred-GABARAPL1.

2.2 Lignées cellulaires

2.2.1 Les lignées MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-549 et ZR-75-1

Ces lignées sont issues de cancers du sein et ont été utilisées pour rechercher l'expression de l'ARNm *gabarapl1* par RT-PCR quantitative. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le Tableau VIII. La lignée MCF-7 nous a été gracieusement fournie par le Dr Saez (Centre hospitalier Lyon Sud, France) et les lignées MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-549 et ZR-75-1 par le Dr Olivier Delattre (Institut Curie-Inserm U830).

Lignée cellulaire	Age de la patiente	Type tumoral	Origine cellulaire	Sous-type moléculaire	Statut hormonal	Expression de HER2	Mutation de p53/BRCA1
MCF-7	69 ans	adénocarcinome	épanchement pleural	luminal	RE+ RP+	non	non/non
MDA-MB-231	51 ans	carcinome canalaire invasif	épanchement pleural	basal	RE- RP-	non	oui/non
MDA-MB-436	43 ans	carcinome canalaire invasif	épanchement pleural	basal	RE- RP-	non	oui/oui
BT-549	72 ans	carcinome canalaire invasif	tumeur primaire	basal	RE- RP-	non	oui/non
ZR-75-1	63 ans	carcinome canalaire invasif	fluide ascitique	luminal	RE+ RP-	non	non/non

Tableau VIII : Principales caractéristiques des différentes lignées de cancer du sein humain utilisées. BRCA1 : BReast CAncer 1 ; HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2 ; RE : Récepteur aux Estrogènes ; RP : Récepteur à la Progestérone. D'après Neve et collaborateurs (2006), Elstrodt et collaborateurs (2011).

2.2.2 La lignée Flp-in-HEK293

La lignée HEK293 est dérivée de cellules embryonnaires de rein humain immortalisées par un adénovirus de type 5 (Graham *et al.*, 1977). Ces cellules sont obtenues à partir d'un fœtus avorté. Elles sont initialement décrites comme ayant une origine épithéliale mais de

nouvelles études ont montré que ces cellules possèdent de nombreuses propriétés semblables à celles des neurones immatures présents dans le rein embryonnaire (Shaw *et al.*, 2002).

La lignée cellulaire Flp-in-HEK293, fournie par la société Invitrogen correspond à la lignée HEK293 modifiée par transfection de façon stable par le vecteur pFRT/*lacZeo*. Ainsi, les cellules transfectées possèdent au sein de leur génome un site FRT et un gène de fusion *lacZ/Zéocine*. Le gène de fusion *lacZ/Zéocine* confère aux cellules une activité β -galactosidase ainsi qu'une résistance à la zéocine.

2.2.3 Les lignées MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS, HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS, MCF-7 Dsred-GABARAPL1 et HEK293 Dsred-GABARAPL1

Les lignées MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS expriment de manière stable la protéine GABARAPL1 étiquetée par l'épitope FLAG en position N-terminale et l'épitope 6HIS en position C-terminale. La lignée MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS exprime le gène de résistance à l'hygromycine. Le fragment *flag-gabarapl1-6his* est inséré dans la lignée Flp-in-HEK293 par recombinaison homologue catalysée par la Flp recombinase codée par le vecteur pOG44 entre le site FRT présent dans le génome des cellules Flp-in-HEK293 et celui présent sur le vecteur recombinant pcDNA5/FRT *flag-gabarapl1-6his*. Cette intégration spécifique permet l'expression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS sous la dépendance du promoteur CMV (CytoMégaloVirus). Cette intégration confère également aux cellules une résistance à l'hygromycine et une perte de la résistance à la zéocine (Figure 24).

Les lignées MCF-7 Dsred-GABARAPL1 et HEK293 Dsred-GABARAPL1, établies au laboratoire (Chakrama *et al.*, 2010) expriment de manière stable la protéine GABARAPL1 fusionnée à la protéine Dsred de fluorescence rouge en position N-terminale. Ces lignées expriment le gène de résistance à la néomycine.

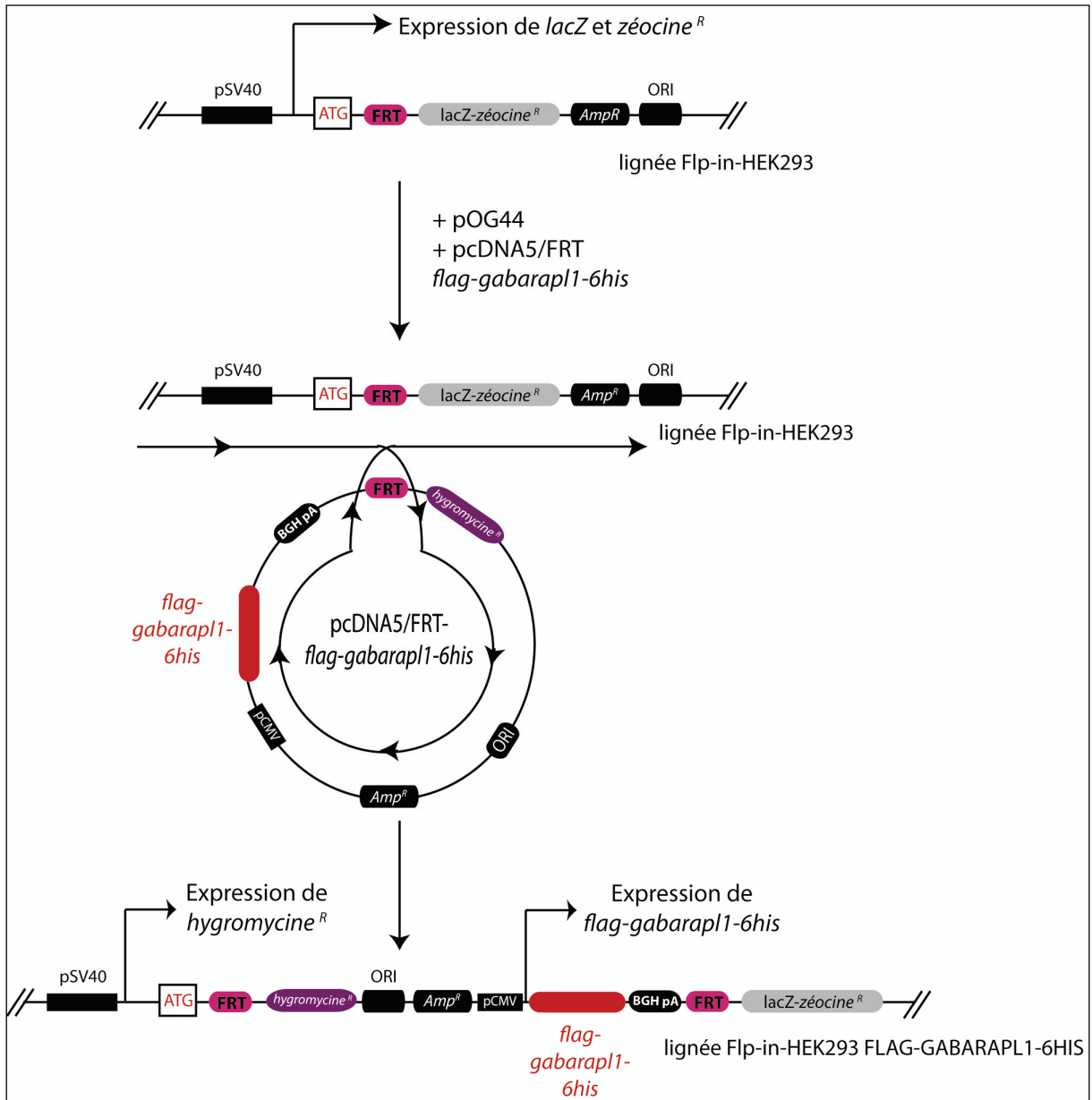


Figure 24 : Etablissement de la lignée stable Flp-in-HEK293-FLAG-GEC1-6HIS. *Amp^R* : gène de résistance à l'ampicilline ; *hygromycine^R* : gène de résistance à l'hygromycine ; *zéocine^R* : gène de résistance à la zéocine ; *lacZ* : gène codant la β -galactosidase ; pCMV : promoteur du CytoMégaloVirus ; pSV40 : promoteur du Virus Simien 40 ; SV40 pA : site de polyadénylation de SV40 ; BGH pA : site de polyadénylation de BGH (Bovine Growth Hormone) ; ori = origine de répliation du plasmide pUC.

3 TECHNIQUES COURANTES D'AMPLIFICATION ET DE CLONAGE DE L'ADN

3.1 Amplification d'ADN par PCR

La partie codante de l'ADNc *gabapapll* de cobaye étiquetée ou non par les épitopes *flag* et *6his* est amplifiée par PCR à partir du vecteur pcDNA 3.1 *gabapapll* afin de créer les vecteurs recombinants pSBet *flag-gabapapll-6his*, pcDNA-5/FRT *flag-gabapapll-6his*, pGFP-GABARAPL1 et pGABARAPL1-GFP. Le mélange réactionnel est le suivant : 200 µM de dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 15 ng d'ADN plasmidique, 1,5 mM de MgCl₂, du tampon 1X *Taq* polymérase (Promega), 1 U de *Taq* polymérase (Promega) dans un volume final de 25 µl. Les différentes amorces utilisées sont décrites dans le Tableau IX. La PCR est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystem), d'après le protocole suivant : 3 min de dénaturation à 92°C suivie de 35 cycles composés d'une étape de dénaturation pendant 30 s à 92°C, d'une étape d'hybridation pendant 1 min à 56°C ou 58°C et d'une étape d'élongation pendant 1 min à 72°C.

Amorces	Séquences	Sites de restriction
Sens <i>XbaI gabapapll</i>	5' AAATCTAG <u>A</u> ATGAAGTTCAGTACAAGGA 3'	<i>XbaI</i>
Rev <i>BglII gabapapll</i>	5' TTTAGATCTCTTCCCATAGACACTCTCAT 3'	<i>BglII</i>
<i>NheI</i> Flag Sens	5' AAAGCTAGCATGGATTATAAAGATGATGATG 3'	<i>NheI</i>
6His <i>NotI</i> Rev	5' TTTGCGGCCGCTTATCAATGATGATGATGATG 3'	<i>NotI</i>
For- <i>gabapapll-BglII</i>	5' TTTTTTAGATCTAAGTTCAGTACAAGGAGGAC 3'	<i>BglII</i>
Rev- <i>gabapapll-EcoRI</i>	5' CTACTCTCACAGATACCCTTCATTATTCTTAAGTTTTT 3'	<i>EcoRI</i>
For- <i>gabapapll-XhoI</i>	5' GCCGATCTCGAGATGAAGTTCAGTACAAGGAG 3'	<i>XhoI</i>
Rev- <i>gabapapll-SacII</i>	5' GACCGGCCGCCGTTTCCCATAGACACTCTCATC 3'	<i>SacII</i>

Tableau IX : Séquences des différentes amorces utilisées pour les réactions de PCR. Le site de restriction éventuel inclus dans les amorces est souligné.

3.2 Restriction enzymatique

Les restrictions des fragments d'ADN obtenus par PCR ou des différents vecteurs plasmidiques sont effectuées pendant 2 h à 37°C avec 1 unité d'enzyme par µg d'ADN dans le tampon indiqué par le fournisseur (Fermentas).

3.3 Ligature

Les ligatures dans le vecteur pGEM-T easy sont effectuées pendant 1 h à température ambiante en présence de 50 ng de vecteur pGEM-T easy, 150 ng du produit de PCR et 1 unité de T₄ ADN ligase (Promega) dans le tampon de réaction recommandé par le fournisseur [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA et 50% glycérol]. Les ligatures dans les vecteurs pSBet, pcDNA5/FRT, pcDNA3.1, pEGFP-C1, pEGFP-N3, pDsred sont effectuées pendant une nuit à 4°C dans le même tampon en ajoutant 100 ng de vecteur linéarisé par les enzymes de restriction correspondantes, 300 ng des fragments d'intérêt digérés par ces mêmes enzymes et 2 unités de T₄ ADN ligase (Promega).

3.4 Extraction des ADN plasmidiques

3.4.1 Mini-préparation par lyse alcaline

Cette technique permet de purifier des plasmides à partir de cultures de 2 ml. Après sédimentation, les bactéries sont lysées par une solution de SDS 1%-NaOH 0,2 M. L'ADN chromosomique dénaturé est ensuite co-précipité avec les protéines par ajout d'une solution d'acétate de sodium (5 M)/acide acétique glacial (11,5%). L'ADN plasmidique, contenu dans le surnageant, est purifié par extraction phénolique puis lavé et précipité à l'éthanol.

3.4.2 Maxi-préparation

Cette technique permet de purifier une grande quantité de plasmides à partir de culture de 200 ml. L'utilisation de chromatographie échangeuse d'ions (QIAfilter Plasmide Maxi Kit, Qiagen) permet d'obtenir une majorité de plasmide en conformation super enroulée afin d'augmenter l'efficacité de transfection. Les extractions sont réalisées en respectant les recommandations du fabricant.

3.5 Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries *E. coli* compétentes (souche JM109 ou BL21-DE3, Invitrogen) sont incubées pendant 30 min sur glace avec 10 à 100 ng d'ADN issus de la réaction de ligature. Un choc thermique à 42°C est réalisé pendant 1 min et les bactéries sont à nouveau conservées sur glace pendant 2 min. Les bactéries sont remises en culture dans 900 µl de LB pendant 1 h 30 à 37°C puis étalées sur milieu sélectif gélosé composé de LB-Agar (15 g/l) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) ou de la kanamycine (100 µg/ml).

3.6 Séquençage

Le séquençage des ADN plasmidiques pGEMT-easy, pSBet *flag-gabarapl1-6his*, pcDNA5/FRT *flag-gabarapl1-6his*, pcDNA 3.1 *flag-gabarapl1-6his*, pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pDsred-GABARAPL1, pDsred-GABARAP, et le séquençage des sondes *gabarapl1* et *gabarap* ont été réalisés par Fabrice Poncet (Ingénieur dans notre équipe, Plateforme séquençage, IFR133) au moyen d'un séquenceur automatique (Applied Biosystems, 3130 Genetic Analyser).

4 CULTURE CELLULAIRE

4.1 Entretien des cellules

4.1.1 Milieux de culture

Les cellules sont incubées en atmosphère humide contrôlée en CO₂ (5%) à 37°C. Les cellules HEK293, BT-549, ZR-75-1 sont cultivées en milieu complet constitué de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) additionné de 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), de 1% de L-glutamine, d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine), d'antifongique (Fungizone 0,23 U/ml) et de 100 µg/ml de zéocine. Les cellules HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS et HEK293 Dsred-GABARAPL1 sont cultivées dans le même milieu à la différence de l'antibiotique de sélection. La zéocine est remplacée par l'hygromycine (100 µg/ml) pour les cellules HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS et par le G418 (100 µg/ml) pour les HEK293 Dsred-GABARAPL1. Les cellules MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436 sont entretenues en milieu complet constitué de DMEM supplémenté de 5 % de SVF, de 1% de L-glutamine, d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml ; streptomycine 100 µg/ml), d'antifongique (Fungizone 0,23 U/ml). Les cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et MCF-7 Dsred-GABARAPL1 sont cultivées dans le même milieu en ajoutant comme antibiotique de sélection de l'hygromycine (100 µg/ml) et du G418 (100 µg/ml) respectivement.

4.1.2 Passage des cellules

Les cellules MCF-7 et HEK293 sont entretenues deux fois par semaine etensemencées à raison de 10 000 cellules /cm² dans des boîtes de culture de 75 ou 55 cm² dans du milieu complet frais. Pour le passage des cellules, le surnageant de culture est éliminé et remplacé par 3 ml de Hank's-EDTA 0,03% qui est ensuite à son tour éliminé pour être

remplacé par 1 ml de trypsine 0,25%. Après une incubation de 10 minutes à 37°C, la trypsine est inactivée par ajout de 8 ml de milieu complet. Les cellules sont prélevées et centrifugées pendant 5 min à 600 g. Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de milieu complet et la quantité de cellules nécessaire estensemencée dans une nouvelle boîte et du milieu complet est ajouté en quantité suffisante pour 10 ml.

4.1.3 Congélation et décongélation des cellules

Pour la congélation, des cellules en phase exponentielle de croissance (de $5 \cdot 10^6$ à $5 \cdot 10^7$ cellules) sont trypsinées puis reprises dans 10 ml de milieu complet. Après centrifugation (5 min, 500 g), le culot est remis en suspension dans 1 ml de DMEM pour les cellules MCF-7 ou dans 1 ml d'un mélange constitué de 60% de DMEM et de 40% de SVF pour les cellules HEK293, puis 10% de DMSO est ajouté. La suspension cellulaire est congelée progressivement dans un récipient contenant de l'isopropanol pendant une nuit à -80°C, puis plongée dans l'azote liquide à -196°C où les cellules peuvent être conservées sans limitation de durée.

Concernant la décongélation, les cellules sont décongelées rapidement à 37°C. Après centrifugation (10 min, 500 g) dans 10 ml de milieu complet, le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 ml de milieu complet puis placé dans une boîte de culture de 75 ou 55 cm².

4.2 Transfection cellulaire

4.2.1 Transfection transitoire

Les cellules MCF-7 Dsred-GABARAPL1 sontensemencées en plaques 24 puits à raison de 25 000 cellules/cm², cultivées 48 h dans du milieu complet, puis transfectées par 500 ng du vecteur pGFP-HSP90β (Jet Prime, Polyplus Transfection). Le vecteur est incubé avec l'agent de transfection (Jet Prime reagent) en quantités deux fois plus importante (1000 ng) dans 500 μl d'un tampon particulier (Jet Prime Buffer) pendant 10 min à température ambiante. Ce volume est ajouté au milieu de culture des cellules MCF-7 à transfecter et une incubation de 24 h est réalisée. Les cellules HEK293 sontensemencées en boîtes de 55 cm² à raison de 90 000/cm², cultivées 48 h dans du milieu complet, puis transfectées par 10 μg du vecteur pGFP-HSP90β (Transfast, Promega). Le vecteur est dilué dans du DMEM en présence d'une quantité deux fois plus importante de liposomes (20 μg Transfast). Ce mélange est incubé 10 min à température ambiante, puis déposé sur les cellules préalablement rincées avec 10 ml de

DMEM. Les cellules sont ensuite incubées 2 h avec les complexes ADN-liposomes à l'étuve (CO₂ 5%, 37°C). La transfection est arrêtée par ajout de 12 ml de milieu complet.

4.2.2 Transfection stable

La lignée Flp-in-HEK293 est co-transfectée de façon stable par le vecteur recombinant pcDNA5/FRT *flag-gec1-6his* et par le vecteur pOG44 codant la Flp recombinase alors que la lignée MCF-7 est transfectée par le vecteur pcDNA 3.1 *flag-gabarapl1-6his*. En parallèle, un contrôle avec les vecteurs vides pcDNA5/FRT et pcDNA 3.1 est réalisé.

Les cellules sontensemencées dans des boîtes 55 cm² à raison de 200 000 ou 400 000 cellules/cm² et sont transfectées 24 h plus tard. Les quantités d'ADN plasmidiques utilisées sont : 10 à 20 µg pour les vecteurs pcDNA5/FRT, pcDNA5/FRT *flag-gec1-6his*, pcDNA3.1 et pcDNA3.1 *flag-gabarapl1-6his* et 9 à 18 µg pour le vecteur pOG44. La transfection est réalisée à l'aide de liposomes (Transfast, Promega) suivant le même protocole utilisé pour transfecter transitoirement les cellules HEK293. Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont sélectionnées pendant environ 20 jours dans du milieu complet supplémenté avec de l'hygromycine (400 µg/ml). Les clones provenant des cellules MCF-7 transfectées sont isolés dans des cylindres en verre stériles, trypsinés et ensemencés séparément les uns des autres afin de permettre leur amplification. Les clones provenant des cellules HEK293 transfectées sont isolés en les grattant avec un cône de pipette de 20 µl et aspirés avec 200 µl de milieu pour être ensuite amplifiés.

4.2.3 Test de viabilité cellulaire

- **Principe**

Le principe du test est basé sur la réduction du Thiazolyl Blue Tétrazolium Bromide (MTT) par les déshydrogénases mitochondriales dépendantes du NADH ou du NADPH (Figure 25). Le sel de tétrazolium de coloration jaune est ainsi réduit en formazan par les cellules vivantes. Les cristaux de formazan sont solubilisés par ajout de DMSO entraînant l'apparition d'une coloration violette. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

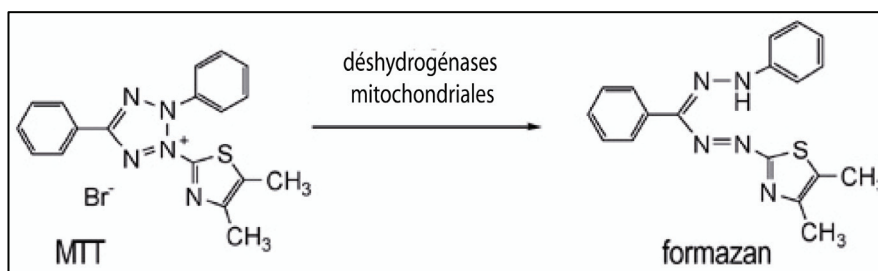


Figure 25°: Réduction du MTT en formazan par les déshydrogénases mitochondriales.

- **Protocole**

Les cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS sontensemencées en plaques 96 puits à raison de 10 000 et 7000 cellules/cm² respectivement. Le lendemain de l'ensemencement, une plaque de 96 puits est centrifugée pendant 5 min à 200 g puis les cellules sont traitées avec 100 µl par puits de sel de tétrazolium MTT (0,5 mg/ml) dilué dans une solution saline de Hank's. Les cellules sont incubées 2 h à 37°C en atmosphère humide contrôlée en CO₂ (5%) puis la plaque est centrifugée pendant 5 min à 300 g. Le sel de tétrazolium est ensuite éliminé et 50 µl de DMSO sont ajoutés par puits. L'intensité de coloration est estimée par mesure de l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (ELX800 Bio-Tek instruments). Chaque clone testé est ensemencé dans 16 puits et deux expériences indépendantes sont réalisées.

- **Analyse statistique**

Les résultats du test MTT, exprimés en moyenne +/- l'écart-type, ont été soumis à un test de Wilcoxon réalisé à l'aide du logiciel R (version 2.7.1). Une p-value de 0,05 a été choisie comme seuil de significativité.

4.3 Test de prolifération clonale en milieu semi-solide (agar mou)

Les lignées cellulaires tumorales et normales transformées ont la capacité de croître indépendamment de l'ancrage et peuvent ainsi former des colonies sur un milieu semi-solide à base d'agar mou. Le test de prolifération clonale en milieu semi-solide (agar mou) permet donc d'évaluer la tumorigénicité de cellules cancéreuses ou transformées.

Une couche basale de 2 ml de noble agar 1% enrichi en DMEM supplémenté de 5% SVF, de 1% L-Glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et 0,23 U/ml Fungizone a été préparée dans des boîtes de 35 mm de diamètre. Après polymérisation, une couche supérieure de 2,5 ml de noble agar 0,3% enrichi en DMEM complet décrit ci-dessus

contenant 5×10^4 cellules (MCF-7, MCF-7 transfectées par le vecteur vide pcDNA 3.1 ou MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS) est déposée dans les boîtes. Les cultures sont placées sous atmosphère humide, à 37°C et 5% de CO₂ pendant 21 jours. Pour chaque type de cellules, plusieurs séries de photographies des cellules ayant formé des colonies sont réalisées de manière aléatoire. Les colonies de taille supérieure ou égale à 100 µm de diamètre sont alors comptabilisées. Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour le test de viabilité cellulaire (§ 4.2).

4.4 Xénogreffes de cellules MCF-7 parentales, MCF-7 contrôle et MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS dans un modèle de souris « nude »

Les cellules MCF-7 parentales, MCF-7 contrôle (transfectées par le vecteur pcDNA3.1) et MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS ont été injectées en sous-cutané au niveau du flanc droit dans des souris « nude ». Les xénogreffes ont été réalisées en collaboration avec le Pr Christophe Borg appartenant à l'équipe « Interactions Hôte-Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génique » (UMR645) à Besançon. Trois expériences indépendantes faisant varier plusieurs paramètres ont été réalisées et sont décrites dans le Tableau X.

	Expérience n°1	Expérience n°2	Expérience n°3
Lignées cellulaires	MCF-7 contrôle MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS	MCF-7 contrôle MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS	MCF-7 parentales MCF-7 contrôle MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS
Nombre de cellules	1 million	8 millions	10 millions
Nombre de souris par lignée	3	2	3
Nombre de cellules souches mésenchymateuses	500000	500000	0

Tableau X : Conditions expérimentales des différentes xénogreffes réalisées.

4.5 Traitements des cellules

Les cellules MCF-7, MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et MCF-7 Dsred-GABARAPL1 sont traitées 1 µM de 17-AAG (17-N-AllylAmino-17-demethoxyGeldanamycin), un inhibiteur de l'activité ATPasique de HSP90α/β et/ou par 2 µM

de MG132 (carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal), 5 μ M de lactacystine, 25 nM de bortezomib, trois inhibiteurs de l'activité du protéasome, pendant 15 h à 37°C. Un traitement des cellules MCF-7 par du DMSO, servant de contrôle négatif, a été effectué pour les expériences visant à évaluer l'expression de l'ARNm *gabarapl1* suite aux traitements par le 17-AAG et/ou le MG132. Les effets de ces inhibiteurs sur les différentes lignées cellulaires ont été évalués par électrophorèse SDS-PAGE suivi d'un Western blotting ou par microscopie confocale.

5 TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ARN TOTAUX

5.1 Extraction des ARN totaux

Environ 10 millions de cellules MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-549, ZR-75-1 sont décollées suite à l'action de la trypsine. Les cellules sont centrifugées (1000 g, 5 min, 4°C), le surnageant est éliminé puis les cellules sont directement traitées pour l'extraction des ARN. Celle-ci s'effectue en ajoutant 1 ml de Trizol (Invitrogen) au culot de cellules, la solution obtenue est agitée 10 sec à l'aide d'un Vortex, refroidie dans la glace pendant 15 minutes, puis centrifugée (12 000 g, 10 min, 4°C). Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube contenant 200 μ l de chloroforme. Cette étape est suivie d'une agitation par simple inversion des tubes. Après centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C), la phase aqueuse contenant les ARN est transférée dans un nouveau tube de 1,5 ml puis un volume égal d'isopropanol est ajouté et les ARN sont précipités 10 min à température ambiante. La sédimentation des ARN est obtenue par une nouvelle centrifugation (15 000 g, 20 min, 4°C). Le culot d'ARN obtenu est lavé par un volume d'éthanol à 75%, centrifugé, séché et repris par 100 μ l d'eau ultra-pure stérile. Pour éliminer toute trace d'ADN génomique, les échantillons d'ARN sont traités par 1 U/ μ l de DNase I (Fermentas) pendant 30 min à 37°C. La réaction est arrêtée à l'aide d'EDTA 2,5 mM suivie d'une étape de chauffage à 65 °C pendant 10 min. Les échantillons d'ARN sont quantifiés à 260 nm puis stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

5.2 Analyse par RT-PCR semi-quantitative

Suite à l'extraction des ARN totaux, les ARNm sont rétrotranscrits. Le mélange réactionnel, composé d'1 μ g d'ARN totaux, de 1,35 μ M d'oligo (dT)₁₂₋₁₈ et de 1,35 mM de dNTP dans un volume final de 13,5 μ l, est incubé 10 min à 65°C. Le mélange est ensuite

placé dans la glace pendant 10 min puis incubé 10 min à 37°C. Après ajout de 4 µl de tampon 5X (Promega), le volume de la réaction est ajusté à 19,5 µl d'eau ultra-pure. La réaction de transcription inverse est alors réalisée par ajout de 100 U de M-MLV RT (Promega) puis chauffage à 42°C pendant 1 h. La transcriptase inverse est inactivée par chauffage 15 min à 70°C.

Les ADNc *gabapap11* et *gapdh* (*glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase*) ainsi obtenus à partir de cellules MCF-7 traitées ou non par du 17-AAG et/ou du MG132, dans les conditions décrites dans le paragraphe 4.5, sont amplifiés par PCR. Le mélange réactionnel est le même que celui décrit dans le paragraphe 3.1 à l'exception de l'ADN plasmidique remplacé par 1 µl d'ADNc. Les différentes amorces utilisées sont décrites dans le Tableau XI. La PCR est réalisée d'après le protocole suivant : 3 min de dénaturation à 92°C suivie de 30 cycles composés d'une étape de dénaturation pendant 30 s à 92°C, d'une étape d'hybridation pendant 30s à 60°C et d'une étape d'élongation pendant 1 min à 72°C.

Amorces	Séquences
hum <i>gabapap11</i> sens	5' CCCTCCCTTGGTTATCATCCA 3'
hum <i>gabapap11</i> rev	5' ACTCCCACCCACAAAATCC 3'
<i>gapdh</i> sens	5' CATGAGAAGTATGACAACAGCCT 3'
<i>gapdh</i> rev	5' AGTCCTTCCACGATACCAAAGT 3'

Tableau XI: Séquences des différentes amorces utilisées pour les réactions de PCR.

5.3 Analyse par RT-PCR en temps réel

- **Principe**

Le SYBR Green est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin. En solution, le SYBR Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil (Applied Biosystems, StepOne).

En PCR, que celle-ci soit quantitative ou non, seule la phase exponentielle est représentative de la quantité initiale d'ADNc et donc du messenger d'intérêt. Le cycle de PCR significatif est celui où le signal sort du bruit de fond, ce cycle est appelé Ct (Cycle Threshold). Le Ct est déterminé par l'appareil et correspond au cycle pour lequel le niveau de fluorescence est au-dessus du bruit de fond et au début de la phase exponentielle.

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin puis elle est abaissée jusqu'à la température d'hybridation ce qui provoque la réhybridation des deux brins d'ADN. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est lue tous les 0,6°C pendant cette élévation progressive de température. Le SYBR Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin. Lorsque la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne le relargage du SYBR Green et une diminution de la fluorescence. La température à laquelle 50 % de l'ADN double brin sont dissociés est appelée température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe. Cette courbe permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. Si plusieurs pics sont obtenus à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au T_m attendu, cela signifie que nous sommes en présence d'amplicons ayant une taille différente.

Des PCR effectuées en utilisant différentes dilutions d'ADNc (pur, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) permettent d'obtenir la pente de la courbe $Ct = f(\text{dilution d'ADNc})$ donnée par l'appareil. La formule $E = 10^{(-1/\text{pente})}$ permet de calculer l'efficacité de la PCR pour chaque gène étudié. La méthode de calcul utilisée est la suivante:

Normalisation par le contrôle endogène (gapdh) :

$$Ct \text{ gène cible}^{\text{contrôle}} - Ct \text{ endogène}^{\text{contrôle}} = \Delta Ct^{\text{contrôle}}$$

$$Ct \text{ gène cible}^{\text{échantillon}} - Ct \text{ endogène}^{\text{échantillon}} = \Delta Ct^{\text{échantillon}}$$

Normalisation par le contrôle endogène (lignée ZR-75-1) :

$$\Delta Ct^{\text{échantillon}} - \Delta Ct^{\text{contrôle}} = \Delta \Delta Ct$$

La formule $2^{-\Delta \Delta Ct}$ permet d'obtenir le ratio d'expression du gène cible.

• Protocole

Les ADNc *gabarapl1*, *gabarap* et *gapdh* humains sont obtenus à partir des cellules MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-549 et ZR-75-1 en suivant les différentes étapes décrites dans les paragraphes 5.1 et 5.2 puis sont amplifiés par PCR en temps réel. Le mélange réactionnel est composé de 1 µl d'ADNc dilué au 1/10, 10 µl de Mix 2X (MasterMix SYBR Green, Applied Biosystems), 500 nM de chaque amorce dans un volume final de 20 µl.

Les amorces spécifiques sont choisies à l'aide du logiciel Primer Express 3.0. Les différentes amorces utilisées pour amplifier les ADNc *gabapap11* et *gapdh* sont décrites dans le Tableau XI. Les amorces utilisées pour amplifier l'ADNc *gabapap* sont les suivantes :

hum *gabapap* sens : 5' GCCTTTCCCATCCTGCTGTA 3'

hum *gabapap* rev : 5' AGGAAGGGATTGCTGGGTTCT 3'

Le protocole d'amplification est le suivant : 10 min de dénaturation à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une étape de dénaturation pendant 30 s à 95°C et d'une étape d'hybridation-élongation pendant 1 min à 60°C. Des triplicats sont réalisés pour chaque échantillon puis les calculs sont ensuite effectués à l'aide du système Applied Biovision 2.1 en tenant compte de l'efficacité de chaque couple d'amorces.

6 TECHNIQUES POUR L'EXPRESSION, LA PURIFICATION ET L'ANALYSE DES PROTEINES

6.1 Extraction des protéines

Les lysats protéiques totaux de cerveau de rat et de cellules en culture sont obtenus suite à l'incubation des tissus homogénéisés par passages successifs au potter ou des cellules pendant 30 min sur glace dans un tampon de lyse spécifique au type d'expérience réalisé. Un tampon de lyse constitué de 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0,5% NP-40, 1% Triton X100, inhibiteurs de protéases (104 mM AEBSF, 1,5 mM pepstatine A, 1,4 mM E-64, 4 mM bestatine, 2 mM leupeptine, 80 µM aprotinine ; 1/1000 ; Sigma-Aldrich) est utilisé pour les expériences de GST pull-down (§ 6.3.1) et un tampon de lyse composé de 50 mM HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% NP-40, inhibiteurs de protéases (104 mM AEBSF, 1,5 mM pepstatine A, 1,4 mM E-64, 4 mM bestatine, 2 mM leupeptine, 80 µM aprotinine ; 1/1000 ; Sigma-Aldrich) est utilisé pour les expériences d'immunoprécipitation (§ 6.3.2). La lyse est suivie d'une étape de centrifugation (16000 g, 30 min, 4°C) puis le surnageant correspondant au lysat protéique est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

6.2 Expression et purification des protéines de fusion

Les bactéries *E. coli* BL21-DE3 transformées par les plasmides d'expression codant la protéine GST et les protéines de fusion GST-GABARAPL1, GST-GABARAPL1 (22-117), GST-HSP90 α sont cultivées dans 10 ml de milieu LB (Tryptone 1%, d'extrait de levure 0,5%

et de NaCl 1%) additionné d'ampicilline (0,1 mg/ml) à 37° C sous agitation jusqu'à une absorbance de 0,6 à 600 nm. L'expression des protéines est induite pendant 2 h par 0,5 mM d'IPTG. Les bactéries sont ensuite centrifugées (5000 g, 10 min, 4°C) et le culot est repris dans 800 µl d'un tampon de lyse PBS (0,137 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄)-1% Triton X100 en présence d'inhibiteurs de protéases (104 mM AEBSF, 1,5 mM pepstatine A, 1,4 mM E-64, 4 mM bestatine, 2 mM leupeptine, 80 µM aprotinine ; 1/1000 ; Sigma-Aldrich). Une sonication 3 fois 15 sec sur glace permet d'augmenter l'efficacité de la lyse. Après centrifugation, (10000 g, 20 min, 4°C), les surnageants contenant la GST ou les protéines fusionnées à la GST sont incubés avec 100 µl d'une suspension de billes de glutathion agarose (Sigma-Aldrich) pendant 2 h à 4°C sous agitation rotative. Après trois lavages avec du PBS enrichi en NaCl (0,5 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), les protéines de fusion fixées aux billes de glutathion agarose sont prêtes pour être utilisées par la technique de GST pull-down. De plus, l'expression des différentes protéines de fusion est contrôlée par coloration au bleu de Coomassie.

La protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS est purifiée par chromatographie d'affinité au nickel grâce à sa queue histidine (Qiagen). Après culture des bactéries *E. coli* transformées par le plasmide d'expression codant la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans 100 ml de LB, l'induction de l'expression de la protéine de fusion par l'IPTG est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot de bactéries est incubé dans 5ml de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 0,2 mM EDTA, 500 mM KCl, 10 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoéthanol, 1 mg/ml lysozyme) pendant 30 min sur glace. Après sonication (3 fois 15 s sur glace), le lysat bactérien est ensuite centrifugé (16000 g, 30 min, 4°C) et le surnageant est incubé avec la résine de nickel (500 µl pour 500 ml de culture bactérienne) pendant 2 h à 4°C. Après centrifugation, (5000 g, 5 min, 4°C), la résine est lavée 3 fois dans le tampon de lavage (20 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 0,2 mM EDTA, 100 mM KCl, 20 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoéthanol, 0,5 mM PMSF). La protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS est ensuite éluée par des concentrations croissantes d'imidazole (50 à 250 mM).

6.3 Techniques d'étude d'interactions protéiques

6.3.1 GST pull-down

- **Principe**

La technique de GST-pulldown permet l'étude d'interactions protéiques *in vitro*. Elle est basée sur l'utilisation de protéines fusionnées à la protéine GST. Ces protéines sont tout

d'abord incubées avec des billes de glutathion-agarose pour permettre leur fixation sur ces billes par liaison de la GST au glutathion. Par la suite, un lysat protéique ou une protéine purifiée sont incubés avec les complexes protéines de fusion/billes de glutathion-agarose. Après plusieurs lavages successifs, les protéines ayant interagi avec la protéine fusionnée à la GST sont éluées soit de manière compétitive à l'aide de glutathion, soit par des conditions dénaturantes à l'aide de tampon de charge. Une centrifugation permet de séparer le culot de billes du surnageant contenant la protéine de fusion en interaction avec un partenaire potentiel. Après électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un électrotransfert sur une membrane de PVDF, l'interaction de la protéine fusionnée à la GST avec le partenaire protéique potentiel est ainsi mise en évidence. L'illustration de cette technique est décrite ci-dessous.

- **Protocole**

Après expression dans les bactéries *E. coli* et fixation sur des billes de glutathion agarose (protocole décrit précédemment), les protéines GST, GST-GABARAPL1, GST-GABARAPL1 (22-117) et GST-HSP90 α sont utilisées dans des expériences de GST pull-down. Les lysats totaux contenant les partenaires protéiques potentiels sont préparés par incubation des cellules ou des tissus homogénéisés dans les conditions décrites dans le paragraphe 6.1.

Les protéines GST, GST-GABARAPL1 et GST-GABARAPL1 (22-117) sont incubées avec 5 mg d'un lysat protéique de cerveau de rat ou 1 mg d'un lysat de cellules HEK293 transfectées transitoirement par le vecteur GFP-HSP90 β alors que la protéine GST-HSP90 α est incubée avec 500 ng de la protéine purifiée FLAG-GABARAPL1-6HIS. Ces incubations sont réalisées pendant une nuit à 4°C sous agitation rotative. Après trois lavages avec du PBS enrichi en NaCl (0,2 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), les protéines sont éluées dans du tampon de charge (78 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2,5% SDS, 12,5% glycérol, 6,25% β -mercaptoéthanol, 0,025% bleu de bromophénol) puis séparées sur gel SDS-PAGE. Les gels sont soit colorés au bleu de Coomassie et utilisés pour l'identification de nouveaux partenaires de GABARAPL1 par spectrométrie de masse, soit soumis à Western blotting pour l'étude des interactions entre GABARAPL1 et HSP90 α/β . Les conditions des différentes expériences de GST pull-down réalisées sont répertoriées ci-dessous (Tableau XII).

Interactions étudiées	Tampon de GST pull-down	Quantité de protéines utilisées	Technique d'analyse des protéines
GST-GABARAPL1 + lysate protéique de cerveau de rat	10 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl ₂ , 0,5% NP-40, 1% Triton X100, inhibiteurs de protéases (1/1000)	5 mg de lysate protéique de cerveau de rat	Coloration au bleu de Coomassie puis spectrométrie de masse ou Western blotting anti-HSP90 α/β (TebuBio)
GST-HSP90α + FLAG-GABARAPL1-6HIS	PBS (0,137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄)	50 ng de FLAG-GABARAPL1-6HIS	Western blotting anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore)
GST-GABARAPL1/GST-GABARAPL1 (22-117) + lysate de cellules HEK293 GFP-HSP90β	10 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl ₂ , 0,5% NP-40, 1% Triton X100, inhibiteurs de protéases (1/1000)	1 mg de lysate de cellules HEK293 GFP-HSP90 β	Western blotting anti-GFP (Chemicon Millipore)

Tableau XII : Différentes expériences de GST pull-down réalisées.

6.3.2 Immunoprécipitation

• Principe

La technique d'immunoprécipitation permet l'étude d'interactions protéiques *in vivo*. Cette technique est basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques d'une protéine dans le but d'isoler cette protéine en interaction avec un ou plusieurs partenaires des autres protéines présentes en solution. Les protéines en interaction avec la protéine d'intérêt captée par l'anticorps sont de cette manière co-immunoprécipitées. Pour isoler le complexe anticorps-protéine formé, des protéines d'origine bactérienne, telles que les protéines A ou G, ayant une forte affinité pour les immunoglobulines sont utilisées. Ces protéines bactériennes sont en fait couplées à des billes d'agarose ou de sépharose qui permettent ainsi de récupérer le complexe anticorps-protéine par centrifugation ou à l'aide d'un aimant si les billes ont la particularité d'être magnétiques.

• Protocole

L'interaction entre GABARAPL1 et la protéine HSP90 α/β est étudiée à partir de cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et de cerveau de rat.

Différents anticorps permettant d'immunoprécipiter la protéine GABARAPL1 sont utilisés : anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group) ou anti-FLAG (Sigma-Aldrich). Deux μ g d'anticorps anti-GABARAPL1 ou 1 μ g d'anticorps anti-FLAG sont incubés avec 30 μ l de

billes magnétiques couplées à la protéine G (Dynabeads 50%/50%, Invitrogen) pendant 10 min à température ambiante sous agitation rotative.

Les lysats protéiques totaux de cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et de cerveau de rat contenant les partenaires protéiques potentiels sont obtenus suite aux conditions d'extraction décrites dans le paragraphe 6.1.

Après capture magnétique des billes, 100 µg d'un lysat protéique de cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS ou 500 µg d'un lysat protéique de cerveau de rat sont incubés pendant 30 min à température ambiante sous agitation rotative avec les complexes billes/anticorps anti-FLAG ou anti-GABARAPL1 respectivement. Après capture magnétique des billes, le lysat est éliminé et les billes sont lavées trois fois dans du PBS. Les protéines sont éluées dans 20 µl de tampon de charge puis séparées sur gel SDS-PAGE suivi de Western blotting à l'aide des anticorps anti-GABARAPL1 (Chemicon) et anti-HSP90α/β (TebuBio).

6.4 Spectrométrie de masse

Les bandes d'intérêt correspondant aux partenaires protéiques potentiels de GABARAPL1 sont repérées visuellement suite à la coloration au bleu de Coomassie du gel de polyacrylamide (10%) puis découpées à l'aide d'un scalpel en morceaux de 1 mm³. Ces morceaux de gel sont alors lavés dans du NH₄HCO₃ 0,1 M pendant 10 min puis déshydratés dans de l'acétonitrile pendant 10 min.

Les étapes suivantes ont ensuite été réalisées par Géraldine Lucchi, membre de la plateforme protéomique CLIPP (Clinical and Innovation Proteomic Platform) Besançon-Dijon.

Les morceaux de gel sont ensuite incubés successivement à l'obscurité dans une solution constituée de 10 mM TCEP/0,1 M NH₄HCO₃ pendant 30 min à 37 °C, dans de l'acétonitrile pendant 8 min, dans une solution constituée de 55 mM iodoacétamide/0,1 M NH₄HCO₃ pendant 20 min, dans du NH₄HCO₃ 0,1 M pendant 2 min et dans de l'acétonitrile pendant 8 min.

Chaque morceau de gel est alors digéré par 20 µl d'une solution composée de 10 ng/µl de trypsine réhydratée, de 50 mM d'acide acétique, de 40 mM de NH₄HCO₃ et de 10% d'acétonitrile (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, PROMEGA) pendant 30 min à 4°C. Quinze µl de cette solution sont éliminés et 10 µl de 40 mM NH₄HCO₃/10% acétonitrile sont ajoutés puis une incubation de 2 h à 37 °C est réalisée.

Une étape de concentration des peptides sur phase C18 (PerfectPure Eppendorf C18) est réalisée selon les recommandations du fabricant. Les peptides concentrés (0,5 µl) sont déposés sur cible d'acier rectifié et mélangés avec 1 µl d'une matrice HCCA (Bruker Daltonics, Allemagne) à 3,5 mg/mL dans 50/50 acétonitrile/acide trifluoroacétique 0,5 %. Les peptides sont analysés en mode MS (spectrométrie de masse) et MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) sur un spectromètre de masse de type MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation)-TOF (Time-Of-Flight)/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Allemagne). L'identification des protéines est effectuée par recherche des peptides dans la banque de données MSDB (Mass Spectrometry protein sequence DataBase) de rat.

6.5 Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines sont solubilisées par addition de tampon de charge. Les échantillons sont dénaturés pendant 3 min à 100°C avant d'être chargés sur le gel (composé d'un gel de séparation à 10%, 12,5% ou 15% d'acrylamide pH 8,8 et d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide pH 6,8). La migration est réalisée dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 8,3, SDS 0,1%) à une tension de 100 à 190 V jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel.

Les protéines du gel sont soumises à un Western blotting ou sont révélées par une solution de bleu de Coomassie R-250 (2,5% dans acide acétique/méthanol/eau, 10%, 50%, 40%) pendant 1 h sous agitation. Ils sont ensuite décolorés dans une solution d'acide acétique 7%, méthanol 30%.

6.6 Western blotting

Les protéines, après électrophorèse dénaturante en présence de SDS, sont transférées sur une membrane de PVDF (Biorad) sous l'effet d'un champ électrique dans le tampon de transfert (méthanol 10%, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 8,3). Le transfert est effectué pendant 1h sous l'action d'une tension constante de 100 V.

La membrane est ensuite placée dans une solution de TBS, Tween 20 0,1% supplémenté de 5% de lait écrémé pendant 1h à température ambiante sous agitation afin de saturer tous les sites non spécifiques. Elle est ensuite incubée pendant 1h ou une nuit sous agitation avec l'anticorps primaire monoclonal ou polyclonal [anticorps monoclonal anti-FLAG (1/6000, Sigma-Aldrich), monoclonal anti-6HIS (1/1000, Amersham), polyclonal anti-GABARAPL1 (1/2000, Chemicon Millipore), polyclonal anti-GABARAPL1 (1/1000, Protein Tech Group), polyclonal anti-GFP (1/5000, Chemicon Millipore), monoclonal anti-HSP90α/β (1/2000,

TebuBio), polyclonal anti-HSP84 (1/3000, Thermo Scientific), polyclonal anti-actine (1/10000, Sigma-Aldrich), anti-tubuline (1/10000, Abcam)] dilué dans du TBS, Tween 20 0,1% supplémenté de 0,5% de lait écrémé. Après lavages avec du TBS, Tween 20 0,1 % (3 x 5 min), la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire conjugué à la Horseradish Peroxydase (HRP) dilué au 1/20000 dans du TBS, Tween 20 0,1% supplémenté de 0,5% de lait écrémé. La membrane est lavée dans du TBS, Tween 20 0,1 % (3 x 5 min) puis dans du TBS. L'activité peroxydase est révélée à l'aide du kit ECL Plus (GE HealthCare Life Sciences) et d'un film photographique.

6.7 Immunohistochimie

Avant le traitement immunohistochimique, les coupes au cryostat sont immergées 2 fois pendant 10 minutes dans du tampon PBS-0,3% Triton X-100. La technique d'immunofluorescence indirecte est ensuite utilisée afin de révéler les protéines GABARAPL1 et HSP90 α/β . Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire polyclonal anti-GABARAPL1 (1:200) (Protein Tech Group) dilué dans du PBS contenant 0,1 % Triton X100, 10% de lait écrémé et 0,01% d'azide de sodium une nuit en chambre humide à température ambiante. Après trois lavages de 10 min dans le tampon PBS-0,3% Triton X100, les coupes sont ensuite incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin couplé à l'Alexa Fluor-488 (Invitrogen, 1/800) dilué dans la même solution que celle utilisée pour diluer l'anticorps primaire.

Les coupes sont ensuite lavées trois fois 10 min dans le tampon PBS-0,3% Triton X100 puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-HSP90 α/β (1/400) dilué dans du PBS-0,3% Triton X100 une nuit en chambre humide à température ambiante. Après trois lavages de 10 min dans le tampon PBS-0,3% Triton X100, un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris couplé à l'Alexa Fluor-555 (Invitrogen, 1/800) dilué dans du PBS-0,3% Triton X100.

Les coupes sont lavées dans les mêmes conditions que précédemment puis montées entre lame et lamelle dans un milieu PBS-0,3% Triton X100/glycérol. Les coupes sont conservées à 4°C et peuvent être observées au microscope confocal.

6.8 Microscopie confocale

Les observations des cellules MCF-7 Dsred-GABARAPL1 sont réalisées avec un microscope confocal Olympus IX81. L'acquisition des images est effectuée avec une caméra DP75 et le logiciel Fluoview FV 1000.

7 EXPERIENCE DE MACRO-ARRAY

Afin d'évaluer le niveau d'expression de *gabarapl1* et de *gabarap* dans les tissus normaux et cancéreux, une expérience de macro-array a été réalisée à l'aide d'une membrane sur laquelle sont fixés les ADNc de 19 tissus différents (normaux et cancéreux) issus de 154 patients (Cancer Profiling array II, ClonTech).

7.1 Synthèse des sondes *gabarapl1* et *gabarap*

Les ARN totaux des cellules HEK-293, exprimant *gabarapl1* et *gabarap*, sont extraits comme décrit dans le paragraphe 5.1.

Les transcrits *gabarapl1* et *gabarap* ne diffèrent que par leurs régions UTR-3', les sondes ADNc doivent donc s'hybrider dans ces régions afin de discriminer ces deux transcrits. Les sondes sont synthétisées par PCR à l'aide des couples d'amorces H-UTR 3'-*gabarapl1* (sens: 5'-TGTGGTAGTGGACCATACCTGG-3', anti sens : 5'-TCCAAGGAAGGGGTGAGATA-3') ou H-UTR 3'-*gabarap* (sens: 5'-CTCATTCTACAAAGAGAGAGG-3', anti sens: 5'-CTCCTACCTTCCCCCCAC-3') (Eurogentech). Ces PCR à partir de 1 µl de produit de RT (HEK-293) sont réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 0,5 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, de tampon 1X *Taq* polymérase et de 2,5 Unité de *Taq* polymérase (Promega). La PCR est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystem), d'après le protocole suivant : 3 min de dénaturation à 94°C, suivie de 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 58°C et 40 sec à 72°C, puis d'une phase d'élongation de 10 min à 72°C. Les fragments amplifiés sont purifiés sur colonne NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel), puis séquencés.

Après dénaturation (10 min à 95°C), 50 ng des sondes *gabarapl1*, *gabarap* et *ubiquitine* (fournie avec le système de macro-array) sont marquées par 50 µCi de α[³²P]-dCTP par « random priming » (Random Primer DNA Labelling System, Invitrogen) pendant 1 h à 25°C. L'excès de nucléotides marqués est éliminé par chromatographie d'exclusion (Sephadex G50, Sigma).

7.2 Hybridation des sondes

La membrane est préhybridée pendant 2 h à 68°C dans 5 ml/100 cm² de solution ExpressHyb (Clontech) contenant 40 µg d'ADN de sperme de saumon. La solution de préhybridation est éliminée et remplacée par la même solution à laquelle sont ajoutés 50 ng de sonde *gabarapl1* ou *gabarap* préalablement dénaturée pendant 10 min à 95°C puis refroidie sur glace. L'hybridation est réalisée pendant une nuit à 68°C sous agitation.

La membrane est lavée par passages successifs dans trois solutions de stringence croissantes. Le premier rinçage rapide est effectué à température ambiante dans une solution de SSC 2X. Puis, sont effectués trois bains successifs de 15 min dans une solution de SSC 2X/SDS 0,1% à température ambiante ; SSC 0,5X/SDS 0,1% à température ambiante et enfin de SSC 0,1X/SDS 0,1% à 55°C.

La membrane est enveloppée dans un film plastique puis disposée dans une cassette de PhosphorImager[®] placée à -80°C. Après 30 h d'exposition le signal est quantifié par un Storm 840 PhosphorImager[®] (Molecular Dynamics). Les données sont analysées à l'aide du logiciel ImageQuant[™] TL v2005 (GE healthcare Life Sciences).

Après chaque hybridation, les sondes sont déshybridées selon les recommandations du fabricant. Les dépôts ont été normalisés au préalable par le fabricant à l'aide de plusieurs sondes s'hybridant au niveau des ADNc *ubiquitine*, *β-actine*, *glutamate déshydrogénase* et *RPL13A (60S Ribosomal Protein L13A)*. Nos résultats sont de plus normalisés grâce à l'hybridation d'une sonde *ubiquitine*.

RESULTS

PUBLICATION I

High expression of gabarapli is associated with better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer.

Alexandre Berthier*, **Stéphanie Seguin***, Annie Sasco, Jean-Yves Bobin, Guy De Laroche, Jean Datchary, Simone Saez, Claire Rodriguez-Lafrasse, Fabrice Tolle, Annick Fraichard, Michaël Boyer-Guittaut, Michèle Jouvenot, R. Delage-Mourroux and Françoise Descotes.

British Journal of Cancer (2010), 102:1024-1031.

Une diminution, voire une perte d'expression de *gabarapl1*, a été observée pour la première fois par analyse en macro-array dans notre laboratoire dans différentes lignées cancéreuses, HK-60, K-562, MOLT-4 (issues de leucémies), Raji et Daudi (issues de lymphome de Burkitt), HeLa S3 (issue d'un cancer de col de l'utérus), SW480 (issue d'un adénocarcinome colorectal) et A549 (issue d'un carcinome du poumon) (Nemos *et al.*, 2003). De plus, dans le cadre de la thèse de Fabrice Tolle (2008), l'expression de *gabarapl1* a été explorée dans différents types de méningiomes de grade I. Ainsi, ces études ont montré que *gabarapl1* est différentiellement exprimé avec le taux le plus faible observé dans les méningiomes psammomateux. Plusieurs facteurs, tels que le sexe et l'âge des patients, sont corrélés avec l'expression de *gabarapl1*. Dans les méningiomes transitionnels et méningothéliaux, le taux de messagers *gabarapl1* est supérieur chez les femmes par rapport à aux hommes alors que l'inverse est observé dans les méningiomes psammomateux. Par ailleurs, plus l'âge des patientes augmente, plus le taux d'ARNm *gabarapl1* diminue.

D'autres données suggèrent une implication de *gabarap* dans le développement et/ou la progression tumoral. Ces données sont toutefois contradictoires en fonction de l'origine tissulaire des cellules cancéreuses. L'analyse en micro-array, menée au laboratoire, a également montré une faible expression de *gabarap* dans les lignées cancéreuses testées, mais les variations observées étaient moins importantes que celles observées pour *gabarapl1* (Nemos *et al.*, 2003). De plus, Roberts et collaborateurs ont montré que l'expression de GABARAP est un facteur de bon pronostic pour les patients atteints de neuroblastome (Roberts *et al.*, 2004). Par ailleurs, une faible expression du gène *gabarap* et de la protéine GABARAP a été observée dans la lignée de cellules de cancer du sein CAL51. La surexpression de la protéine GABARAP dans cette lignée a pour effet de réduire *in vitro* la prolifération et la croissance en agar mou des cellules tumorales et *in vivo*, chez des souris immuno-déficientes, de supprimer la tumorigénicité (Klebig *et al.*, 2005). En revanche, une forte expression de GABARAP dans des cancers colorectaux (Miao *et al.*, 2010) est corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients et une expression élevée de GABARAP est observée dans des adénomes et cancers de la thyroïde (Roberts *et al.*, 2009).

Ainsi, dans le but de déterminer si le taux de l'ARNm *gabarapl1* subissait des variations d'expression semblables à celles observées dans les lignées tumorales, nous avons étudié son expression en macro-array dans des tissus de sein normaux et tumoraux correspondants et provenant de dix patients différents, à l'aide d'une sonde s'hybridant spécifiquement au

niveau de son UTR-3'. Les tissus cancéreux provenaient de sept carcinomes canauxaires infiltrants, d'un carcinome lobulaire, d'un carcinome mucineux et d'une maladie de Paget et s'étendaient des stades I à III. De plus, afin de mieux comprendre la fonction exercée par *gabarapl1* dans les cancers, nous avons surexprimé de façon stable la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans la lignée cancéreuse de sein humain MCF-7, puis nous avons évalué l'effet de cette surexpression sur la croissance de ces cellules à l'aide d'un test MTT. La lignée MCF-7 n'exprime pas la protéine GABARAPL1 en des taux détectables par western blotting. Par ailleurs, nous avons eu l'opportunité d'établir une collaboration avec le Docteur Françoise Descotes (Service de Biologie des Tumeurs au Centre Hospitalier Lyon-Sud) afin d'étudier l'expression du messenger *gabarapl1* dans 265 tumeurs de sein par des expériences de RT-PCR quantitative.

Le mécanisme par lequel *gabarap* et *gabarapl1* influent sur le développement et/ou la progression tumoral n'est pas encore élucidé à ce jour.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la **publication I** et indiquent que :

- le messenger *gabarapl1* est faiblement exprimé dans les tissus tumoraux de sein en comparaison avec les tissus normaux correspondants par macro-array.
- l'expression de *gabarapl1* peut être associée à différents facteurs pronostiques ou prédictifs: la taille de la tumeur, le grade histopronostique, l'envahissement ganglionnaire et le statut RE/PR.
- aucune différence significative d'expression de *gabarapl1* n'est observée entre les carcinomes canauxaires et lobulaires.
- la forte expression de *gabarapl1* est corrélée à un faible risque d'apparition de métastases et donc à une augmentation de la survie dans le cas de patientes atteintes de cancer du sein avec envahissement ganglionnaire (pN+).
- la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans les cellules MCF-7 diminue la croissance cellulaire.

Full Paper

High expression of *gabarapl1* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer

A Berthier^{1,6}, S Seguin^{1,6}, AJ Sasco², JY Bobin³, G De Laroche⁴, J Datchary⁵, S Saez³, C Rodriguez-Lafrasse³, F Tolle¹, A Fraichard¹, M Boyer-Guittaut¹, M Jouvenot¹, R Delage-Mourroux¹ and F Descotes^{*,3}

¹Université de Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, IFR 133, Besançon EA3922, France; ²Epidemiology for Cancer prevention, Inserm U 897 Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France; ³Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France; ⁴Clinique Mutualiste, St Etienne, France; ⁵Centre Hospitalier Régional, Annecy, France

BACKGROUND: This study evaluates the relation of the early oestrogen-regulated gene *gabarapl1* to cellular growth and its prognostic significance in breast adenocarcinoma.

METHODS: First, the relation between GABARAPL1 expression and MCF-7 growth rate was analysed. Thereafter, by performing macroarray and reverse transcriptase quantitative-polymerase chain reaction (RT–qPCR) experiments, *gabarapl1* expression was quantified in several histological breast tumour types and in a retrospective cohort of 265 breast cancers.

RESULTS: GABARAPL1 overexpression inhibited MCF-7 growth rate and *gabarapl1* expression was downregulated in breast tumours. *Gabarapl1* mRNA levels were found to be significantly lower in tumours presenting a high histological grade, with a lymph node-positive (pN+) and oestrogen and/or progesterone receptor-negative status. In univariate analysis, high *gabarapl1* levels were associated with a lower risk of metastasis in all patients (hazard ratio (HR) 4.96), as well as in pN+ patients (HR 14.96). In multivariate analysis, *gabarapl1* expression remained significant in all patients (HR 3.63), as well as in pN+ patients (HR 5.65). In univariate or multivariate analysis, *gabarapl1* expression did not disclose any difference in metastasis risk in lymph node-negative patients.

CONCLUSIONS: Our data show for the first time that the level of *gabarapl1* mRNA expression in breast tumours is a good indicator of the risk of recurrence, specifically in pN+ patients.

British Journal of Cancer advance online publication, 2 March 2010; doi:10.1038/sj.bjc.6605568 www.bjcancer.com
© 2010 Cancer Research UK

Keywords: breast cancer; *gabarapl1*; prognosis; lymph node positive

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among women worldwide, with more than 1.3 million cases each year. The understanding of this disease has progressed considerably and its prognosis has improved because of earlier diagnosis, the introduction of appropriate strategies and the use of novel active treatments (Aapro, 2001; Sasco *et al*, 2003). However, as the tumour-node–metastasis (TNM) stage provides scant information on the growth pattern of each tumour, a large number of new biomarkers have been analysed to predict the risk of recurrence and to help apply the best adjuvant therapy. In this view, we paid attention to a recently identified oestrogen-regulated gene called *gabarapl1* (*GABA_A receptor-associated protein-like 1*) or *gec1* (*glandular epithelial cell 1*), which is thought to have an essential role during tumour progression (Nemos *et al*, 2003).

The *gabarapl1* gene was originally identified as an early oestrogen-regulated gene in cultured guinea-pig endometrial glandular epithelial cells (GECs) (Pellerin *et al*, 1993). The human gene was then characterised (GeneBank Accession No. AF087847)

and its coding sequence presents 76.8% identity with that of *gabarap* (*γ-aminobutyric acid type A receptor-associated protein*). Indeed, *gabarapl1* and *gabarap* genes are located on 12p12.3 and 17p13.12 human chromosomes, respectively.

The GABARAPL1 protein is composed of 117 amino acids and is highly conserved throughout evolution, suggesting a critical cellular function. Similar to GABARAP, GABARAPL1 is involved in protein or vesicle intracellular transport through its interaction with cytoskeleton elements. Some publications have suggested that GABARAPL1 and GABARAP might also be involved in tumour development. Indeed, it was reported that lower levels of *gabarap* gene expression predict decreased survival among patients with neuroblastoma (Roberts *et al*, 2004). Klebig *et al* (2005) showed that an ectopic overexpression of the *gabarap* gene inhibits cancer cell proliferation and tumour growth in mice. We reported elsewhere a decrease in *gabarapl1* expression in cancer cell lines (Nemos *et al*, 2003).

To characterise the role of *gabarapl1* in breast cancer, we analysed the level of *gabarapl1* expression in some breast tumour samples and the effect of its induced overexpression on the growth rate of a breast cancer cell line. We also analysed *gabarapl1* mRNA expression in a retrospective cohort of 265 breast tumour biopsy samples using a reverse transcriptase–quantitative polymerase chain reaction (RT–qPCR) protocol to estimate its potential prognostic effect.

*Correspondence: Dr F Descotes, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Sud, Pavillon 3D, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite Cedex 69495, France; E-mail: francoise.descotes@chu-lyon.fr

⁶These authors contributed equally to this work

Received 10 November 2009; accepted 15 January 2010

MATERIALS AND METHODS

Experimental analysis

Cell transfection Human breast cancer cells (MCF-7) were maintained as previously described (Berthier *et al*, 2007). The *gabarap11* coding sequence flanked by two tag sequences coding for a Flag peptide and a six-histidine tail was cloned into a pcDNA3.1 Hygro(-) vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). This construct was called pcDNA3.1-Flag-GEC1-(His)₆. MCF-7 cells were transfected with 40 µg of pcDNA3.1-Flag-GEC1-(His)₆ or pcDNA3.1 control vector, and 40 µl of TransFast reagent (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. The selection of resistant cells was carried out for 20 days with 200 µg/ml hygromycin starting 24 h after transfection until single colonies could be picked.

Western blot analysis Whole-cell lysates (40 µg) were loaded on a 12% SDS-PAGE and a western blot analysis was performed according to the standard protocol (Towbin *et al*, 1979). A monoclonal anti-Flag antibody was used at 1/6000 dilution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Signals were visualised using a goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled anti-mouse antibody (1/20 000) (PARIS, Compiègne, France) and the ECLplus reagent (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) according to the manufacturer's protocol. Three independent experiments were performed for each cell lysate.

Cell proliferation assay MCF-7-Flag-GEC1-(His)₆ (clones 1 and 2) and MCF-7-pcDNA cell lines were plated in 96-well plates (3000 cells per well) and cell proliferation experiments were conducted over a 10-day period using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) (Morel *et al*, 2007). For each clone, two independent experiments were performed in 16 wells. Data are means ± s.d. and differences between clones were assessed using the Wilcoxon test (R software version 2.7.1, <http://cran.r-project.org>).

Macroarray experiment The macroarray experiment was performed using a cancer profiling array II membrane (Clontech, Palo Alto, CA, USA). A 319-bp *gabarap11* probe, specific for the 3' mRNA untranslated region, was prepared as previously described (Nemos *et al*, 2003). A volume of 50 ng of *gabarap11* probe was denaturated (10 min at 95 °C) and randomly labelled (1 h at 25 °C) with 50 µCi of α[³²P]-dCTP (Random Primer DNA Labelling System; Invitrogen). The membrane was incubated overnight with the *gabarap11* probe according to the manufacturer's protocol, exposed for 30 h in a Storm 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) and signals were quantified using ImageQuant TL v2005 software (GE Healthcare Life Sciences). For macroarray normalisation, the membrane was stripped according to the manufacturer's protocol and hybridised with a control ³²P-labelled *ubiquitin* probe.

Clinical analysis

Patients and tumour characteristics Patients treated in three medical centres (Centre Hospitalier Régional Annecy, Chirurgie Oncologique Centre Hospitalier Universitaire Lyon-Sud and Clinique Mutualiste Saint Etienne, France) were included between October 1994 and October 2001 (*n* = 265; Table 1). Patients were selected according to the following criteria: primary breast tumour without inflammatory features, no previous treatment and no evidence of distant metastasis at the time of diagnosis (Descotes *et al*, 2008). The median age at primary surgery was 53 years (range 29–89). The tumour type was determined according to the UICC-WHO criteria (Sobin and Wittekind, 1997) and histological

Table 1 Characteristics of the studied population

Characteristics	All patients		pN0 patients		pN+ patients	
	N = 265		N = 126		N = 139	
	n	%	n	%	n	%
Age (years)						
<47	71	26.8	30	23.8	41	29.5
47–53	62	23.4	31	24.6	31	22.3
53–64	67	25.3	26	20.6	41	29.5
>64	65	24.5	39	31.0	26	18.7
Menopausal status						
Pre	111	41.9	51	40.5	60	43.2
Post	154	58.1	75	59.5	79	56.8
Surgical tumour size						
pT1	114	43.0	70	55.6	44	31.7
≥pT2	139	52.5	52	41.3	87	62.6
ND	12	4.5	4	3.2	8	5.8
Histological type						
Lobular	39	14.7	18	14.3	21	15.1
Ductal	216	81.5	99	78.6	117	84.2
Others	10	3.8	9	7.1	1	0.7
Lymph node status						
0	126	47.5	126	100.0		
1–3	83	31.3			83	59.7
>3	56	21.1			56	40.3
SBR grade in ductal carcinoma						
1	31	14.4	17	17.2	14	12.0
2	114	52.8	58	58.6	56	47.9
3	57	26.4	22	22.2	35	29.9
ND	14	6.5	2	2.0	12	10.3
ER status						
Positive	222	83.8	108	85.7	114	82.0
Negative	43	16.2	18	14.3	25	18.0
PgR status						
Positive	208	78.5	106	84.1	102	73.4
Negative	57	21.5	20	15.9	37	26.6
Adjuvant systemic therapy						
None	25	9.4	25	19.8	0	
Hormone therapy	90	34.0	76	60.3	14	10.1
Chemotherapy	33	12.5	10	7.9	23	16.5
Hormone and chemotherapy	117	44.2	15	11.9	102	73.4

grading was scored according to the Scarff Bloom and Richardson classification (Bloom and Richardson, 1957) only in the ductal carcinomas that represented the majority (81.5%) of cases. Oestrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) were assayed in cytosol using the radioligand reference method (EORTC, 1980). Quality control was based on regular testing of both European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and internal controls. Results were expressed as fmol per mg cytosol protein. ER- and PgR-positive tumours contained >2 and >5 fmol per mg protein, respectively. All patients received locoregional radiotherapy. The majority of node-positive patients and high-risk node-negative patients (age of <35 years, pathological size >20 mm, histological grade of ≥2 and steroid receptor-negative status) received chemotherapy. Almost all ER-positive patients were given hormone treatment.

RT-qPCR analysis Breast cancer tissue biopsy samples were obtained by surgery, selected by the pathologist and immediately stored in liquid nitrogen until processing. The biopsy samples were pulverised using a 'Mikro-Dismembrator' (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) and total RNAs were extracted using TRI Reagent (Sigma). To remove any genomic DNA contamination, total RNAs were treated with RNase-free DNase I and purified using RNeasy microcolumns (Qiagen, Hilden, Germany). RNA quality was verified using an Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A volume of 500 ng of total RNAs was reverse transcribed using M-MLV RT RNase H Minus reverse transcriptase and oligo(dT)₁₅ primer following the manufacturer's instructions (Promega). All cDNA amplifications were performed using 1/20th of the reverse transcription products and the LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland), in the presence of 3 mM MgCl₂ and 0.4 μM of each *gabarapl1* primer. Quantitative PCR was run on a LightCycler instrument (Roche Applied Science) with the following parameters: 10 min at 95 °C for the initial denaturation step, followed by 15 s at 95 °C, 6 s at 60 °C and 12 s at 72 °C per cycle for a total of 40 cycles. The *gabarapl1* primers used (forward: 5'-TTTGGTGCCCTTATCTCAC-3'; reverse: 5'-GGCCATCATGTAGCATTCCCTT-3') for amplification of a 241-bp fragment (GenBank AF287012) were designed using the Primer3 software (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). The amplified cDNA concentration was evaluated using an external curve of standard samples and specific amplification was checked using a melting curve. The PCR kinetics and quantitative data were determined using LightCycler software 4.05 (Roche Applied Science). The *gabarapl1* target concentration was expressed relative to the concentration of the *gapdh* house-keeping gene. The forward primer (5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3') and the reverse primer (5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3') gave an amplification product of 203 bp (GenBank NM_002046). Quality control was assessed using regular testing of two internal controls. Interassay variations were <5% (data not shown).

Statistical analysis The median follow-up at the time of analysis was 54 months (range 2–109). The criterion for statistical analyses was metastasis-free survival (MFS), that is, the delay between the time of primary surgery and the first event: nodal or distant metastasis, or death. Neither local recurrence nor occurrence of a contralateral cancer was taken into account, nor a second primary cancer if it occurred within 2 years. Patients alive without metastasis were censored at the last follow-up date. Analysis of the distribution of *gabarapl1* expression in relation to usual prognostic parameters was performed using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test. Survival probabilities were estimated using Kaplan-Meier estimates and were compared using the log-rank test. Univariate and multivariate analyses were performed using the Cox proportional hazard model. When *gabarapl1* was used as a continuous variable, we used the transformed variable $\log(1/gabarapl1)$, which therefore provided an easier interpretation of the hazard ratio (HR). Multivariate analyses were performed in a stepwise forward manner. A basal model including the clinical, pathological and biological variables (except *gabarapl1*) associated with prognosis was first built. The histological grade that was determined only in ductal carcinomas but not in lobular carcinomas could not be introduced in the basal model. The variables were adjusted for age. The prognostic value of *gabarapl1* was tested after adding this variable to the basal model and the significance of each variable was calculated by comparing nested models using the likelihood ratio (LR) test. Trend tests were performed for ordinal variables. All tests were set at the significance level of $\alpha=0.05$. Confidence intervals (CI) referred to the 95% level. These analyses were performed with the R software (release 2.7.1).

RESULTS

Effect of GABARAPL1 overexpression on MCF-7 growth rate

Previous data have shown that *gabarapl1* mRNA is ubiquitously expressed in human tissues (Nemos *et al*, 2003), but surprisingly low levels were detected in some cancer cell lines, particularly in the MCF-7 breast cancer cell line (data not shown). Therefore, we speculated whether the ectopic expression of GABARAPL1 might modify the growth rate of these cells. To find a solution, we designed a stable MCF-7 cell line overexpressing the double-tagged Flag-GEC1-(His)₆ protein. Among the hygromycin-resistant colonies, 20 clones were selected and GABARAPL1 protein expression was quantified by western blotting. As shown in Figure 1A, high GABARAPL1 levels were observed in clones 1 and 2 when compared with the control cell line. To assess whether overexpression of GABARAPL1 regulated the growth rate of breast cancer cells, we performed a kinetic viability assay (MTT) using wild-type MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and two MCF-7-Flag-GEC1-(His)₆-expressing clones. As shown in Figure 1B, GABARAPL1-expressing clones 1 and 2 showed significantly reduced growth rates over 8 days of culture when compared with control cell lines.

Gabarapl1 expression in normal and tumour breast tissues

As GABARAPL1 overexpression was associated with a decreased cancer cell growth rate, it can be expected that its expression might also be altered in tumour tissues. To test this hypothesis, we analysed *gabarapl1* expression in paired normal and tumour tissues using a cancer profiling array (Figure 2A). A dysregulation of *gabarapl1* expression was found not only in breast tumours but also in several other types of tumours such as kidney, testis, bladder, pancreas and prostate (data not shown). After

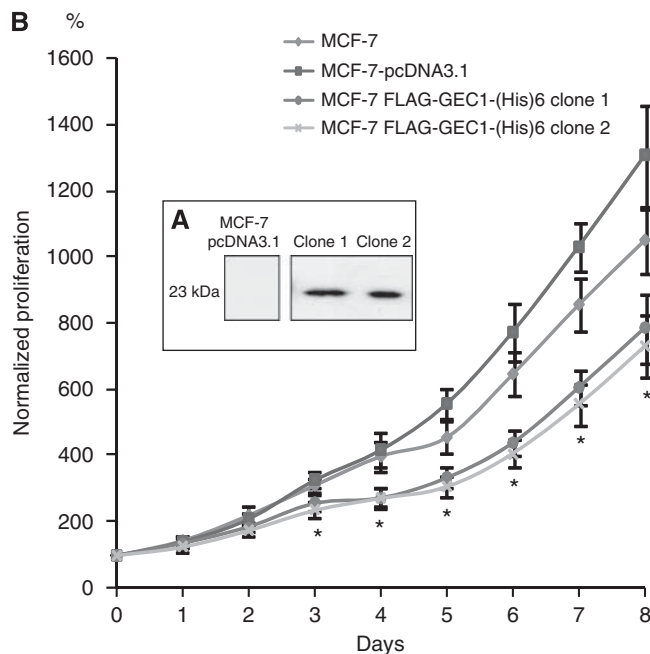


Figure 1 GABARAPL1 overexpression negatively regulates the growth rate of MCF-7 cells. (A) Western blot analysis of MCF-7-pcDNA3.1 (control) and MCF-7-Flag-GEC1-(His)₆ (clones 1 and 2) cells using an anti-Flag antibody. (B) Growth rate of MCF-7 (▲), MCF-7-pcDNA3.1 (■) and MCF-7-Flag-GEC1-(His)₆ clones 1 (○) and 2 (◆) using an MTT assay. * $P<0.05$ (Wilcoxon's test).

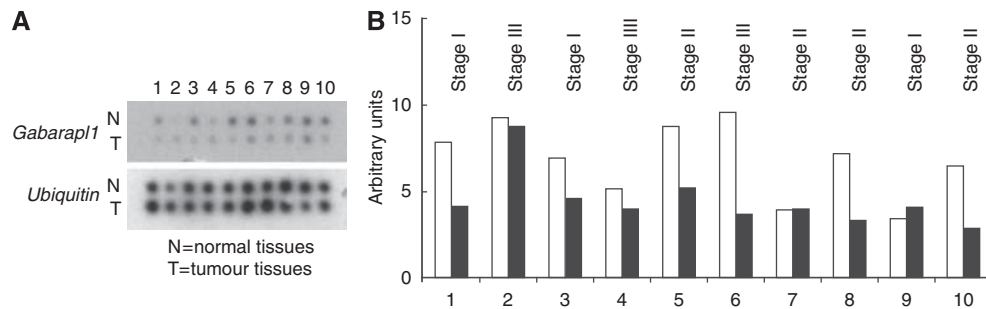


Figure 2 Macroarray hybridisation and analysis. Autoradiography of the membrane hybridised with (A) *gabaprl1* or *ubiquitin* probe. (B) Normalised *gabaprl1* expression using the *ubiquitin* signal in normal (white bars) and tumoural breast tissues (black bars). The tumours at different stages correspond to infiltrating ductal carcinomas (1, 2, 4, 7, 8, 9, 10), mucinous adenocarcinoma (3), Paget's disease (5) and lobular carcinoma (6).

Table 2 *gabaprl1* expression in relation to the usual prognostic factors

Characteristics	All patients			pN0 patients			pN+ patients		
	n	Median	P-value	n	Median	P-value	n	Median	P-value
	N = 265			N = 126			N = 139		
Surgical tumour size									
pT1	114	5.41		70	5.85		44	4.90	
≥pT2	139	3.90		52	4.68		87	3.55	
ND	12		<0.001	4		0.212	8		0.013
Histological type									
Ductal	216	4.34		99	5.23		117	3.90	
Lobular	39	5.34		18	6.27		21	4.71	
Others	10		0.076	9		0.218	1		0.231
Histological grade^a									
1	31	5.52		17	5.52		14	5.48	
2	114	4.96		58	6.12		56	4.33	
3	57	2.96		22	2.95		35	3.09	
ND	14		<0.001	2		<0.001	12		<0.001
Node status									
pN0	126	5.55							
pN+	139	4.01	<0.001						
ER and PgR status									
ER and PgR positive	191	5.08		97	6.07		94	4.50	
ER and/or PgR negative	74	3.24	<0.001	29	3.28	0.002	45	3.21	0.002

^aHistological grade defined only in ductal carcinoma. P-values correspond to Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis test (histological grade).

normalisation with ubiquitin signal, these alterations in *gabaprl1* expression in tumour breast tissues were confirmed: a down-regulation was detected in 7 out of 10 breast tumours (Figure 2B).

Gabarapl1 expression in 265 breast cancer cases

To evaluate the significance of the macroarray data obtained on 10 breast tumours, we analysed *gabaprl1* expression in a cohort of 265 breast tumour biopsy samples. The mean *gabaprl1* value measured by RT–qPCR was 5.03 and the median was 4.54 (range 0.16–17.27). Table 2 shows the median value of *gabaprl1* in relation to several tumour characteristics that are usually linked to prognosis. Indeed, in the whole population, the median *gabaprl1* expression was significantly different in relation to surgical size, histological grade, lymph node, ER and PgR status. The histological type, ductal or lobular, revealed no difference. A

lower *gabaprl1* expression was significantly related to tumour size of >20 mm only in the whole population and in the pN+ subset.

It may be observed that the median values were significantly lower in the pejorative categories of tumours. Therefore, after testing that the *gabaprl1* distribution was log normal (data not shown), for studies requiring a dichotomy of the variable, the cutoff value (6.56) was found to be equal to the upper threshold of the third quartile, allowing a discrimination between high and low *gabaprl1* expression status.

Univariate analysis

Results of the univariate MFS analysis (Table 3) show the relation between *gabaprl1* expression levels and common prognostic factors: low levels were associated with pejorative prognostic factors. As usually observed, age and surgical tumour size were

Table 3 Cox univariate analysis for metastasis-free survival

Characteristics	All patients (n = 265)			pN0 patients (n = 126)			pN+ patients (n = 139)		
	HR	CI	P-value	HR	CI	P-value	HR	CI	P-value
Age (years)									
<48	3.22	1.50–6.93		6.29	0.73–54.16		2.42	1.06–5.54	
48–53	1.30	0.55–3.09		2.18	0.20–24.09		1.06	0.42–2.69	
54–64	0.67	0.26–1.69		1.76	0.16–19.64		0.42	0.15–1.15	
>64	1.00		<0.001	1.00		0.202	1.00		<0.001
Menopausal status									
Pre	1.65	0.97–2.82		3.60	0.93–13.97		1.40	0.77–2.52	
Post	1.00		0.066	1.00		0.064	1.00		0.271
Surgical tumour size									
pT1	1.00			1.00			1.00		
≥pT2	3.64	1.83–7.25	0.001	1.80	0.50–6.44	0.365	3.57	1.50–8.45	0.004
Histological type									
Lobular	1.00			1.00			1.00		
Ductal	0.95	0.47–1.95	0.895	1.99	0.25–15.76	0.516	0.81	0.38–1.75	0.592
Lymph node status									
pN0	1.00								
pN+	3.67	1.85–7.30	<0.001						
Histological grade ^a									
1	1.00			1.00					
2	6.06	0.82–44.93		0.80	0.09–7.21				
3	10.90	1.46–81.46	0.004	1.71	0.19–15.44	0.494			NA ^b
ER and PgR status									
ER and PgR positive	1.00		0.001	1.00		0.261	1.00		<0.001
ER and/or PgR negative	2.47	1.44–4.23		0.31	0.04–2.42		3.43	1.89–6.23	
Gabap11 status									
Log (1/gabap11) ^c	4.96	2.43–10.12	<0.001	1.32	0.20–8.92	0.777	14.96	4.80–46.60	<0.001

Abbreviations: HR = hazard ratio; CI = confidence interval; ER = oestrogen receptor; PgR = progesterone receptor. P-values correspond to Cox regression model. ^aHistological grade defined only in ductal carcinoma. ^bNo events in histological grade 1 tumour subset. ^cHR for an increase of one log (1/gabap11).

significant prognostic factors in the whole population and in the pN+ subset, but not in pN0 patients. In the whole population, lymph-node status was correlated with risk of metastasis (HR 3.67, $P < 0.001$). It was also observed that the risk of metastasis in relation to low *gabap11* levels increased by 4.96-fold in the whole population (CI 2.43–10.12; $P < 0.001$) and by 14.96-fold in the pN+ subset (CI 4.80–46.60; $P < 0.001$). In pN0 patients, *gabap11* expression was not related to risk of metastasis.

Kaplan–Meier curves were constructed after segmentation into two groups on the basis of the *gabap11* expression cutoff (Figure 3). It was observed that high values of *gabap11* expression were related to a good prognosis. They were predictive of longer MFS in all patients (Figure 3A, $P < 0.001$) and in pN+ patients (Figure 3B, $P < 0.001$) but not in pN0 patients (data not shown). It is noteworthy that, in the high *gabap11* pN+ subgroup, only one patient relapsed.

Multivariate analysis

In the whole population, the multivariate analysis applied to the basal model (Table 4) showed, as expected, a significantly higher risk of metastasis associated with surgical tumour size of >20 mm (HR 3.00; $P = 0.002$), lymph node-positive status (HR 2.93; $P = 0.002$) and ER and/or PgR-negative status (HR 2.15; $P = 0.007$).

In pN+ patients, surgical tumour size of >20 mm (HR 3.59; $P = 0.004$) and ER- and/or PgR-negative status (HR 2.92; $P = 0.001$)

were significantly related to higher metastasis risk, whereas none of these factors were related to the risk of metastasis in pN0 patients. When *gabap11* expression was included in this basal model, low *gabap11* values were associated with an increased metastasis risk by 3.63-fold in the whole population (CI 1.48–8.93, $P = 0.005$) and by 5.65-fold in the pN+ subset (CI 1.84–17.29, $P = 0.002$). It is observed that in pN0 patients, the risk of metastasis was not significantly related to *gabap11* expression levels.

DISCUSSION

In this study, we provide for the first time an insight into the effect of GABARAPL1 overexpression in breast cancer cells and into the effect of *gabap11* expression level in a large retrospective cohort of breast tumours.

We have reported that GABARAPL1 is able to bind to tubulin and could be involved in the transport of the GABA_A receptor (Mansuy et al, 2004). It also has an important role in the transport of other receptors such as the κ-opioid receptor (Chen et al, 2006). Nevertheless, *gabap11* mRNA is widely distributed in human tissues (Nemos et al, 2003), suggesting that GABARAPL1 protein is not only involved in the transport of receptors but probably has a more complex role in cells. Particularly, it could be involved in cell cycle regulation, as it interacts with tubulin (Mansuy et al, 2004). Our study showed that MCF-7 cells overexpressing GABARAPL1

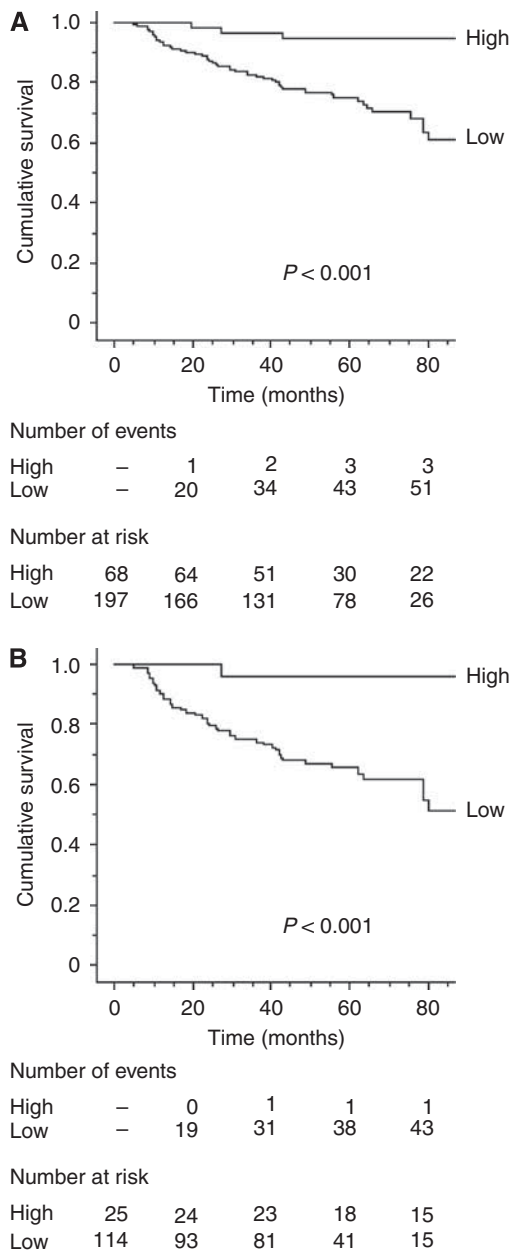


Figure 3 Kaplan–Meier curves for metastasis-free survival probabilities according to *gabaprl1* expression categorised with quartiles from (A) the whole population ($n = 265$) and (B) pN+ patients ($n = 139$). Low: $\leq 75\%$ quartile; high: $> 75\%$ quartile.

protein had a significantly decreased growth rate, compared with control cell lines. This finding was in favour of a potential role of GABARAPL1 in the control of cell proliferation as previously reported for GABARAP overexpression in CAL51 cells (Klebig *et al*, 2005). These data suggested that *gabaprl1* expression could be altered in rapidly growing breast tumour tissues. In fact, in the macroarray experiment, most breast tumour tissues presented weaker *gabaprl1* mRNA levels than did normal tissues. These results concurred with previous findings in breast cancer cell lines, in which very low levels of *gabaprl1* mRNAs were observed (data not shown). Experiments are needed to determine whether somatic mutations (Tomlinson, 2001) or epigenetic events (Lo and Sukumar, 2008) are responsible for the *gabaprl1* downregulation in these cell lines.

Gabaprl1 expression has been analysed in this study for the first time in a retrospective cohort of 265 breast tumours. The data obtained during this investigation showed that *gabaprl1* expression is significantly different in relation to usual prognostic criteria such as tumour size, lymph-node and steroid receptor status. It is also shown that *gabaprl1* expression median values are different in relation to tumour oestrogen and progesterone receptor status: the median is higher in ER- and PgR-positive tumours, in agreement with Mansuy *et al* (2004) who showed that *gabaprl1* is an oestrogen-regulated gene.

Furthermore, we showed that tumours expressing low levels of *gabaprl1* were observed to be significantly associated with high risk of metastasis in the pN+ subset (HR = 14.96, $P < 0.001$) but not in pN0 patients (Table 3). In the whole population, Kaplan–Meier curves (Figure 3A) showed that after 80 months of follow-up, only 3 out of 25 patients showing high *gabaprl1* levels presented a recurrence compared with 51 out of 77 patients with low *gabaprl1* levels. In the pN+ subset (Figure 3B), 1 out of 16 patients with a high *gabaprl1* level relapsed, compared with 43 out of 58 with a low *gabaprl1* level. These data clearly show that the *gabaprl1* expression level is negatively correlated with the risk of metastasis.

In this study, the difference in *gabaprl1* expression between ductal and lobular types, which show different growth patterns, is not significant. It can be observed that the median *gabaprl1* level is higher in lobular tumours, which are known to be less aggressive than ductal ones (Table 2). The difference in *gabaprl1* expression between both types is not significant, but it can be observed that the number of lobular tumours is very small. Moreover, we found a significant correlation between *gabaprl1* expression and the other pathological features related to prognosis, such as tumour size, histological grade, lymph node and ER and PgR status.

Previous results using RT–qPCR analysis on 235 neuroblastomas showed that lower GABARAP expression levels were associated with more advanced stages (Roberts *et al*, 2004). Moreover, tissue microarray experiments revealed a significant reduction in GABARAP protein expression in a high proportion of 93 breast cancers cases (Klebig *et al*, 2005). However, no correlation was observed between loss of GABARAP expression and clinicopathological features such as grading, tumour size, oestrogen receptor status and age of diagnosis. In the latter publication, the researchers used a polyclonal anti-GABARAP antibody (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX, USA) to perform immunostaining of tissue microarrays. However, we have reason to believe that no commercially available antibody is able to clearly distinguish between GABARAP and GABARAPL1 proteins because of their high degree of identity. Indeed, all the polyclonal commercial and homemade antibodies we have tested so far in the laboratory recognised both GABARAPL1 and GABARAP proteins (Mansuy *et al*, 2004; Tolle *et al*, 2008). Therefore, immunostaining analysis is unreliable and, up to now, the unique alternative to differentiate *gabaprl1* and *gabaprl* expression is the use of specific RT–qPCR primers located in 3'-untranslated regions.

It can be considered that despite their high homology, *gabaprl1* and *gabaprl* are probably differently regulated during the course of breast cancer progression. Nevertheless, it would be of great interest to further study the expression levels of these two closely related genes to determine whether these present the same pattern of expression in breast cancers.

CONCLUSIONS

Our data strongly suggest that, in breast cancers, high levels of *gabaprl1* mRNA are correlated with a low risk of metastasis. This is valid in the whole population, but specifically in lymph

Table 4 Cox multivariate analysis of metastasis-free survival

Characteristics	All patients (n = 253)			pN0 patients (n = 122)			pN+ patients (n = 131)		
	HR	CI	P-value	HR	CI	P-value	HR	CI	P-value
<i>Basal model</i>									
Surgical tumour size									
pT1	1.00			1.00			1.00		
≥pT2	3.00	1.49–6.00	0.002	1.81	0.51–6.48	0.360	3.59	1.51–8.54	0.004
Lymph node status									
pN0	1.00								
pN+	2.93	1.46–5.88	0.002						
ER and PgR status									
ER and PgR positive	1.00			1.00			1.00		
ER and/or PgR negative	2.15	1.24–3.75	0.007	0.35	0.04–2.80	0.325	2.92	1.56–5.46	0.001
<i>Basal model and gabrapl1</i>									
Surgical tumour size									
pT1	1.00			1.00			1.00		
≥pT2	2.68	1.33–5.42	0.006	1.62	0.44–5.95	0.464	3.21	1.34–7.70	0.009
Lymph node status									
pN0	1.00								
pN+	3.12	1.54–6.309	0.002						
ER and PgR status									
ER and PgR positive	1.00			1.00			1.00		
ER and/or PgR negative	1.73	0.96–3.12	0.007	0.21	0.02–2.27	0.200	2.41	1.26–4.62	0.008
Gabrapl1 status									
Log (1/gabrapl1) ^a	3.63	1.48–8.93	0.005	3.79	0.32–45.64	0.294	5.65	1.84–17.29	0.002

Abbreviations: HR = hazard ratio; CI = confidence interval; ER = oestrogen receptor; PgR = progesterone receptor. All values were adjusted by age. ^aHR for an increase of one log (1/gabrapl1). P-values correspond to Cox regression model.

node-positive patients (HR 5.65; *P* = 0.002). The *gabrapl1* gene might show an important effect on tumour progression. To our knowledge, all publications currently available only describe the role of GABARAPL1 protein during the intracellular transport of receptors in the brain. Hence, this investigation is the first one describing a new interesting function of this gene in breast tissues. These data open up a new point of view on the importance of this small protein called GABARAPL1 in different pathways and tissues and offer a great potential for this gene as a novel prognostic indicator for patients developing breast cancer.

REFERENCES

Apro MS (2001) Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th International Conference, St Gallen, February 2001. *Oncologist* **6**: 376–385

Berthier A, Girard C, Grandvilllemin A, Muiyard F, Skaltsounis AL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R (2007) Effect of 7-O-beta-D-glucopyranosylchrysin and its aglycone chrysin isolated from *Podocytisus caramanicus* on estrogen receptor alpha transcriptional activity. *Planta Med* **73**: 1447–1451

Bloom HJ, Richardson WW (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* **11**: 359–377

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

Descotes F, Riche B, Saez S, De Laroche G, Datchary J, Roy P, André J, Bobin JY (2008) Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors in node-negative breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase-type plasminogen activator. *Clin Breast Cancer* **8**: 168–177

EORTC (1980) Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. Workshop, held on 16–17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* **16**: 1513–1515

ACKNOWLEDGEMENTS

This research work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, by the Région Franche-Comté and by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Drôme, Haute-Savoie, Jura, Loire, Saône and Loire and Rhône committees). We are grateful to the clinical teams from Annecy (Vincent B, Chenet P, Knopf JF, Poulleau S, Cocchi P), Lyon (Berger F, Isaac S) and St Etienne (Bouteille C, Griot A, Griot JP, Malvolti B, Villard P). We also thank John Carew for editorial help.

Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, Petersen I (2005) Characterization of γ -aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* **65**: 394–400

Lo PK, Sukumar S (2008) Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* **9**: 1879–1902

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

Morel C, Adami P, Musard JF, Duval D, Radom J, Jouvenot M (2007) Involvement of sulphhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **313**: 3971–3982

Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R (2003) Expression of *gec1/GABARAPL1* vs GABARAP mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **119**: 216–219

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–R21

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
- Sasco AJ, Kaaks R, Little RE (2003) Breast cancer: occurrence, risk factors and hormone metabolism. *Expert Rev Anticancer Ther* **3**: 546–562
- Sobin LH, Wittekind C (eds) (1997) Breast tumours (ICD-O C50). In *TNM Classification of Malignant Tumours*, 5 edn, pp 123–130. Wiley-Liss: New York
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, Jouvenot M (2008) Specific regional distribution of gec1 mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* **1210**: 103–115
- Tomlinson IP (2001) Mutations in normal breast tissue and breast tumours. *Breast Cancer Res* **3**: 299–303
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350–4354

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

- **Evaluation de l'expression de *gabarapl1* et de *gabarap* dans différents tissus cancéreux**

En plus des tissus de sein, le système en macro-array que nous avons utilisé était composé de tissus normaux (134 ADNc) et tumoraux (134 ADNc) provenant de 18 autres organes ainsi que d'ADNc issus de 9 lignées cancéreuses. L'expression des gènes *gabarapl1* et *gabarap* a été recherchée par utilisation de sondes ADNc spécifiques s'hybridant au niveau des UTR-3' sans aucune identité de séquence entre elles. Les résultats obtenus ont été normalisés à l'aide d'une sonde *ubiquitine*. L'ensemble des résultats de cette étude est présenté dans la Figure 26.

Nous avons d'abord remarqué une expression ubiquitaire des gènes *gabarapl1* et *gabarap*. De plus, des différences d'expression sont observables selon les tissus considérés mais globalement *gabarap* semble plus exprimé dans la majorité des tissus comparé à *gabarapl1*. Concernant *gabarapl1*, des variations d'expression ont été observées dans d'autres tissus que le sein entre certains tissus normaux et cancéreux correspondants. En effet, *gabarapl1* est surexprimé dans les testicules et la prostate mais est en revanche sous-exprimé dans plusieurs tissus dont le pancréas, la peau et la vessie (Figure 26A). En revanche, concernant *gabarap*, peu de variations d'expression entre tissus normaux et tumoraux correspondants sont observées (Figure 26B). En particulier, il n'y a pas de diminution de l'expression de *gabarap* dans les tissus cancéreux de sein. De plus, les messagers *gabarapl1* et *gabarap* sont faiblement exprimés dans les 9 lignées cancéreuses testées.

Nous ne pouvons donc pas conclure à une diminution ubiquitaire de *gabarapl1* dans les tissus cancéreux ce qui suggère que la régulation du gène *gabarapl1* est différente selon l'organe considéré.

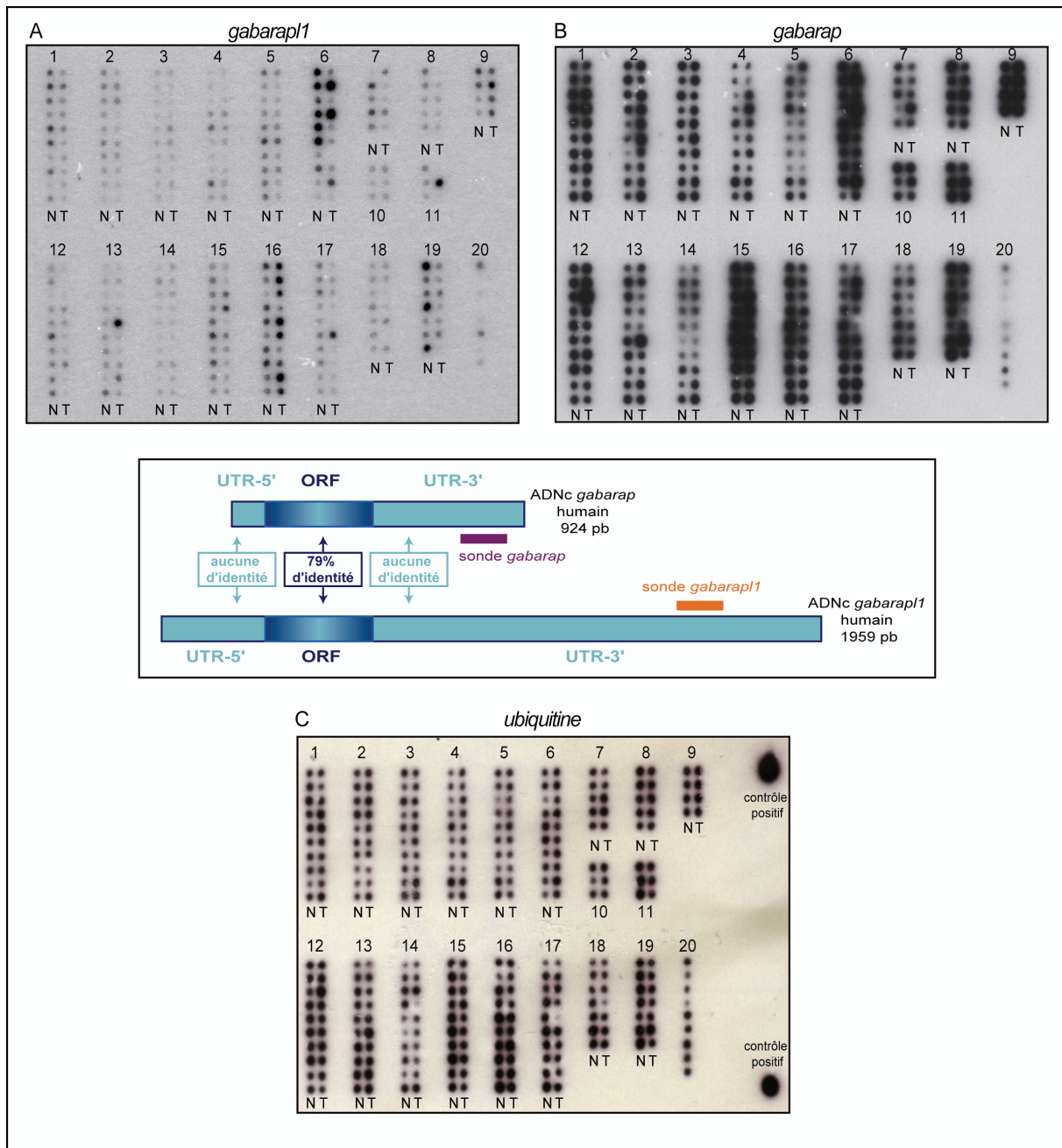


Figure 26 : Analyse par macro-array de l'expression de *gabarapl1* et *gabarap* dans des tissus normaux et tumoraux correspondants provenant de 19 organes différents. Les résultats ont été normalisés à l'aide d'une sonde ubiquitine. **A. Hybridation de la sonde *gabarapl1*.** **B. Hybridation de la sonde *gabarap*.** **C. Hybridation de la sonde *ubiquitine*.** 1 : sein ; 2 : ovaire ; 3 : colon ; 4 : estomac ; 5 : poumon ; 6 : rein ; 7 : vessie ; 8 : vulve ; 9 : prostate ; 10 : trachée ; 11 : foie ; 12 : utérus ; 13 : col de l'utérus ; 14 : rectum ; 15 : thyroïde ; 16 : testicules ; 17 : peau ; 18 : intestine grêle ; 19 : pancreas ; 20 : lignées cellulaires (de haut en bas : HeLa, Daudi, K562, HL-60, G-361, A549, MOLT-4, SW480, Raji). N : tissu normal ; ORF : Open Reading Frame ; T : tissu tumoral ; UTR : UnTranslated Region.

L'ensemble de ces résultats indique une expression différente de *gabarapl1* dans certains tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux correspondants. Dans le sein, l'expression de *gabarapl1* est par ailleurs un facteur de bon pronostic et est liée aux propriétés des tumeurs

telles que le statut hormonal, la taille de la tumeur ou l'atteinte ganglionnaire. Le mécanisme moléculaire mis en jeu dans le sein est probablement complexe dans la mesure où l'ARNm *gabap11* n'est déjà pas exprimé de façon homogène selon les différentes lignées cancéreuses humaines de sein utilisées. Les caractéristiques propres à ces lignées sont à prendre en considération pour l'étude de *gabap11*. Toutes ces données suggèrent que le rôle de *gabap11* dans les cancers est dépendant du tissu, des propriétés spécifiques des différents types de tumeurs et du stade d'avancement de la tumeur.

- **Evaluation de l'expression de *gabap11* et *gabap* dans différentes lignées de cancer du sein humain**

L'expression de *gabap11* et de *gabap* a été évaluée dans différentes lignées de carcinome de sein humain (MCF-7, MDA-MB231, BT-549, MDA-MB-436, ZR-75-1), par RT-PCR quantitative à l'aide d'amorces s'hybridant au niveau des UTR-3'. *Gabap11* et *gabap* sont relativement faiblement exprimés dans les différentes lignées de cancer du sein à l'exception des cellules MDA-MB-436 (Figure 27A). En western blotting, la protéine GABARAPL1 est uniquement détectée dans les cellules MDA-MB-436 alors que la protéine GABARAP est exprimée dans toutes les lignées. Ces deux protéines sont effectivement visibles en western blotting sous forme de deux bandes différentes, GABARAPL1 migrant légèrement moins loin que GABARAP (Figure 27B).

Ces résultats confirment la faible expression de *gabap11* dans différentes lignées de cancer du sein humain mis à part dans les cellules MDA-MB-436.

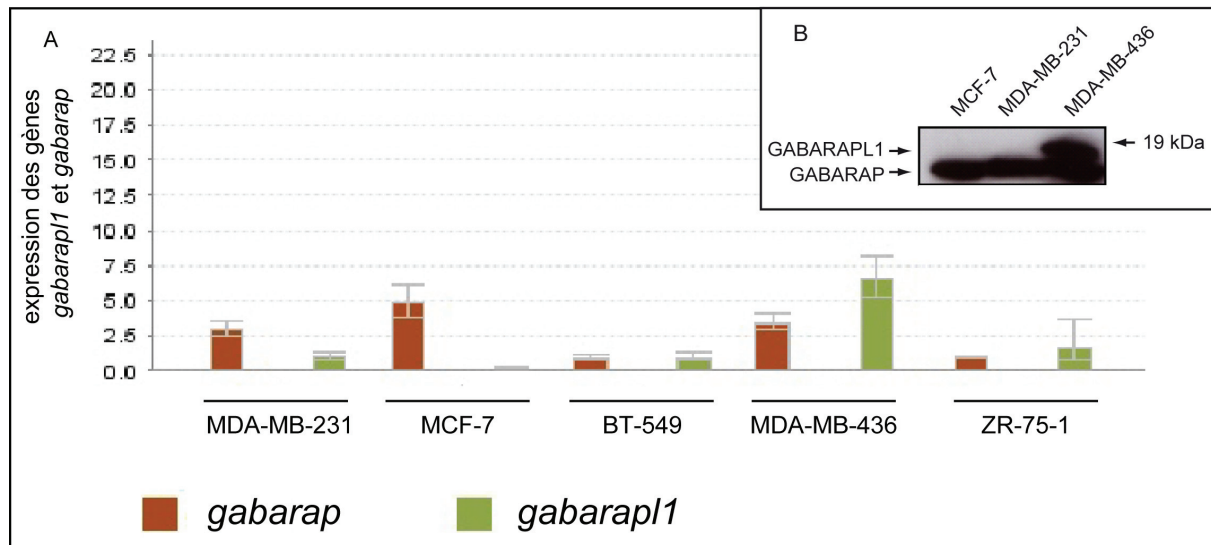


Figure 27 : A. Profil d'expression des ARNm *gabarapl1* et *gabarap* dans différentes lignées cellulaires humaines par RT-PCR quantitative. Les résultats ont été normalisés par le gène *gapdh*. Les valeurs sont exprimées par rapport au taux des ARNm *gabarapl1* et *gabarap* dans la lignée ZR-75-1. **B. Expression des protéines GABARAPL1 et GABARAP dans les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MDA-MB-436 par western-blotting.** L'anticorps anti-GABARAPL1/GABARAP (Chemicon, Millipore) a été utilisé pour détecter les protéines GABARAPL1 et GABARAP à partir de 40 µg de lysats protéiques issus des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MDA-MB-436.

- **Evaluation de la prolifération clonale en milieu semi-solide (agar mou) des cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS**

La caractérisation fonctionnelle de la lignée MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS a été poursuivie en réalisant un test permettant d'évaluer la croissance de cellules cancéreuses sur un milieu semi-solide qui est l'agar mou. Des cellules MCF-7 parentales, transfectées par le vecteur vide et transfectées par le vecteur exprimant FLAG-GABARAPL1-6HIS ont été ensemencées, puis les clones dont la taille était supérieure ou égale à 100 µm ont été comptabilisés 21 jours après ensemencement. Le nombre de clones surexprimant FLAG-GABARAPL1-6HIS était deux fois moins important par rapport au cellules parentales ou transfectées par le vecteur vide (Figure 28). Par conséquent, la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS conduit à une diminution de la croissance en agar mou des cellules cancéreuses MCF-7.

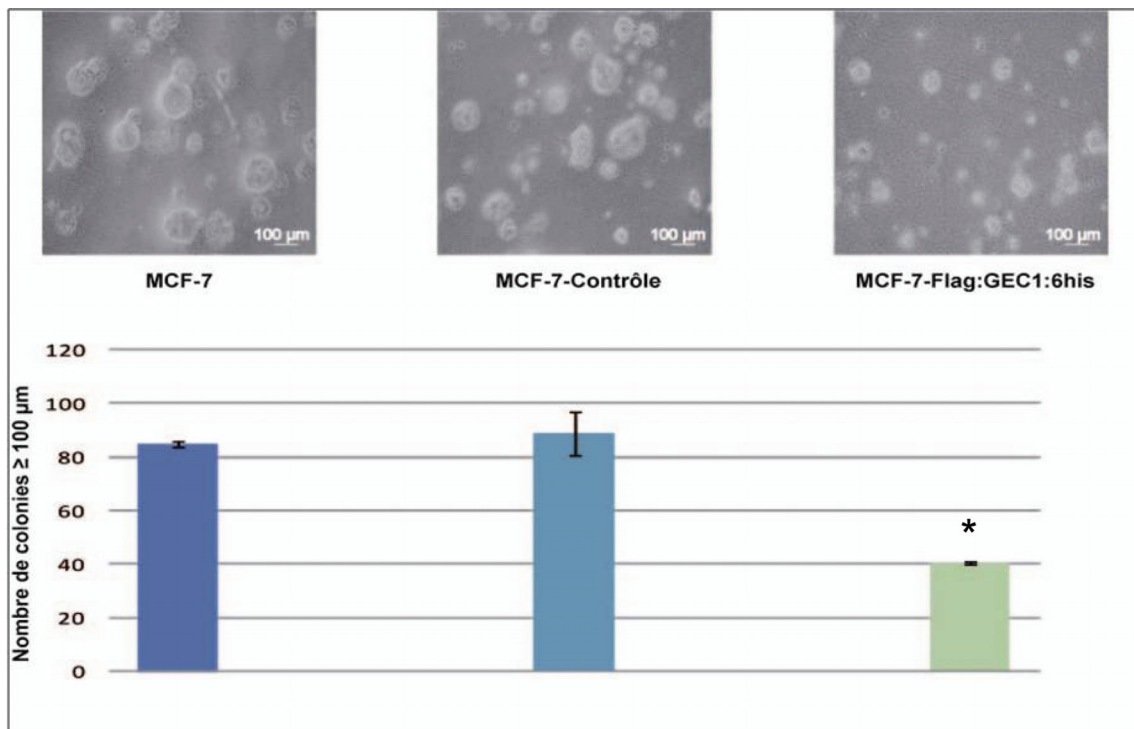


Figure 28 : Mise en évidence de la diminution de la croissance en agar mou des cellules MCF-7 surexprimant FLAG-GABARAPL1-6HIS. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes. * : $p < 0,05$, significativité par rapport aux deux autres lignées.

- **Evaluation de la croissance tumorale suite à l'injection de cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS chez des souris immuno-déficientes**

En collaboration avec le Docteur Christophe Borg appartenant à l'équipe « Interaction Hôte-Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génique » de l'IFR133 à Besançon, nous avons tenté de confirmer ces résultats *in-vivo* chez des souris immuno-déficientes en suivant l'évolution de tumeurs suite à l'injection de cellules cancéreuses. Plusieurs souris ont subi une injection, en sous-cutané au niveau du flanc, de cellules MCF-7 parentales, transfectées par le vecteur vide ou transfectées par le vecteur exprimant FLAG-GABARAPL1-6HIS. Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives réalisées dans différentes conditions, aucune tumeur ne s'est développée, quelque soit la nature de l'injection.

La surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans les cellules MCF-7 pourrait permettre la restauration d'un phénotype normal mais ces résultats encourageants restent encore à confirmer *in vivo*. L'utilisation d'autres lignées de cancer du sein humain est également nécessaire afin de conclure sur l'effet positif de la surexpression de GABARAPL1.

PUBLICATION II

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 and Régis Delage-Mourroux.

La découverte de partenaires des protéines homologues de GABARAPL1, GABARAP, GATE-16 et LC3 a permis de mieux comprendre les fonctions cellulaires assurées par ces protéines. A ce jour, des interactions de ces protéines avec de nombreux partenaires ont pu être identifiées et caractérisées à l'aide de plusieurs techniques (double-hybride, GST pull-down, immunoprécipitation...). Certains de ces partenaires ont contribué à prouver l'implication de GABARAP, GATE-16 et LC3 dans le transport intracellulaire, le processus d'autophagie et les processus de fusion membranaire.

Au commencement de ma thèse en 2007, seuls la tubuline, la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A, le récepteur κ aux opioïdes et la protéine NSF avaient été découverts comme interagissant avec GABARAPL1 (Chen *et al.*, 2006 ; Mansuy *et al.*, 2004). GABARAPL1 était ainsi d'ores et déjà connue comme participant au transport du récepteur κ aux opioïdes et probablement au transport du récepteur GABA_A dans le système nerveux central. Depuis, plusieurs nouveaux partenaires ont émergé, en particulier des protéines jouant un rôle dans le trafic intracellulaire ou le processus d'autophagie. La plupart de ces protéines se lie à un ou plusieurs autres membres de la famille Atg8. Par ailleurs, l'expression du messenger *gabarapl1* a été amplement examinée dans le cerveau humain et de rat, permettant d'établir que *gabarapl1* est majoritairement exprimé dans cet organe et qui plus est, le membre de la famille Atg8 le plus représenté (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006b ; Nemos *et al.*, 2003 ; Tolle *et al.*, 2008). Le rôle de la protéine GABARAPL1 dans le système nerveux central méritait donc d'être plus amplement recherché.

Au vu de toutes ces informations, nous avons entrepris la recherche de nouveaux partenaires de GABARAPL1 à partir d'un lysat protéique de cerveau de rat en utilisant la technique de GST pull-down couplée à la spectrométrie de masse.

Les résultats de cette recherche sont présentés dans la **publication II** et indiquent que :

- GABARAPL1 interagit de manière directe ou au sein d'un complexe protéique dans le cerveau de rat avec différentes protéines : la chaîne lourde de la clathrine, RIM2 (regulating synaptic membrane exocytosis 2)-5B, D100 ou dynamine, la sous-unité $\alpha 3$ de l'ATPase Na⁺/K⁺, la sous-unité $\alpha 2$ de la protéine AP-2 (Adaptor Protein-2), HSP84 ou HSP90 β , la sous-unité non ATPase 2 du protéasome 26S, la tubuline α et $\beta 2$, LanCL1 (Lantibiotic synthetase Component C Like-1), GAPDH, guanidine nucleotide binding protein beta 2, MAP1B.

-
- GABARAPL1 interagit *in vitro* de manière directe avec les isoformes α et β de la protéine HSP90.

 - GABARAPL1 interagit *in vivo* avec HSP90 α/β dans le cerveau de rat et dans les cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et la présence des acides aminés 1 à 22 de GABARAPL1 sont importants pour l'interaction.

 - GABARAPL1 co-localise partiellement au niveau de vésicules intracytoplasmiques avec HSP90 α/β dans le cerveau de rat (cortex rétrospinal et *substantia nigra*) et avec HSP90 β dans les cellules MCF-7 Dsred-GABARAPL1.

 - GABARAPL1 est une nouvelle protéine chaperonnée par HSP90 α/β et la rupture de l'interaction de ces deux protéines conduit à la dégradation de GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS et MCF-7 Dsred-GABARAPL1.

 - GABARAPL1 est dégradée par la voie du protéasome et l'inhibition de la dégradation conduit à l'apparition de la forme endogène de GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS.

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

Running title: GABARAPL1 interacts with HSP90 α/β

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 *gecl* [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-

5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) type glutamate and β -adrenergic receptors. GABARAPL1, *via* its interaction with tubulin, is also able to promote tubulin assembly and microtubule bundling [8]. The contribution of GABARAPL1 to intracellular protein transport is not restricted to the brain as demonstrated by its interaction with PX-RICS [Phox-RhoGAP (GTPase-activating protein) involved in the β -catenin-N-cadherin and NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor signaling], a protein that mediates the transport of the N-cadherin / β -catenin complex from the ER to the Golgi apparatus in HeLa cells [12].

Due to the high homology between the different members of the GABARAP family, all GABARAPL1 partners outlined above also interact with one or several of the GABARAP family members. Two proteins, namely alpha-synuclein and ARH (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia) have been described to interact only with the GABARAPL1 protein but their association with other GABARAP family members has not yet been addressed [13, 14].

Some studies have reported a low expression of *gabrarpl1* mRNA in different types of cancers and we recently demonstrated, from the study of a cohort of 265 breast adenocarcinoma biopsies, that patients with a high expression of *gabrarpl1* mRNA present a lower risk of recurrence [15, 16].

Recently, we also described GABARAPL1 as a new marker of autophagosomes. More precisely, we demonstrated that GABARAPL1 is cleaved in the cells to produce its mature form, is linked onto phospholipids and associates with autophagic vesicles [17, 18]. Moreover, it has been suggested that GABARAPL1 plays a role in selective autophagy, a form of autophagy that targets specific proteins or organelles to be degraded in the lysosomes, due to its association with p62/SQSTM1 (Sequestosome 1), NBR1 (Neighbour of Brca1 gene) and Nix1/BNIP3L [BNIP3 like protein (BNIP3: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein)], which have all been described as cargo adapters [19-22].

To search for new functions of the GABARAPL1 protein, we looked for new GABARAPL1 partners in rat brain, a tissue that highly expresses *gabrarpl1*, by using a GST pull-down assay coupled to mass spectrometry. We report here an interaction between GABARAPL1 and the molecular chaperone HSP90 α/β in rat brain and in MCF-7 cells. In cells, this interaction is disrupted by 17-AAG (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin), a specific inhibitor of HSP90 α/β ATPase activity, and is restored

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.

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 *gabarapl1* coding sequence flanked by two tag sequences, coding for a Flag peptide

and a six-histidine tail, respectively, was cloned into the *Xba*I and *Bam*H1:*Bgl*III sites of the pSBet vector, [24] allowing expression of the FLAG-GABARAPL1-6HIS protein in *Escherichia coli* bacteria. The pGST-HSP90 α and the pGFP-HSP90 β vectors were kindly provided by Dr. Altieri (University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA) and Dr. J. Kim (Korea University, Seoul, South Korea), respectively.

2.4. Cell culture and transfection

The HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) (ATCC, CRL-1573) and MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) (ATCC, HTB-22) cells 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% (for the HEK293 cells) or 5% (for the MCF-7 cells) foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, 10270-106) and kept in a 5% CO₂ incubator at 37°C. The MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS and MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cell lines were previously created [17]. These cell lines were maintained in complete medium supplemented with 100 μ g/ml Hygromycin B (PAA, P02-015) and 100 μ g/ml G418 (PAA, P02-012), respectively. TransFast reagent (Promega, E2431) was used to transiently transfect HEK293 cells plated in 10 cm-diameter culture dishes (5 x 10⁶ cells per Petri-dish) and Jet Prime reagent (Polyplus Transfection, 114-07) was used to transiently transfect MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells plated in 24-well plates (5 x 10⁴ cells per well), according to the manufacturer's recommendations. Ten μ g or 500 ng of pGFP-HSP90 β vector were used to transfect HEK293 and MCF-7 Dsred-GABARARAPL1 cells, respectively.

MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells plated in 6-well plates (4 x 10⁵ cells per well) or MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells plated in 24-well plates cultured on glass coverslips (5 x 10⁴ cells per well) were treated overnight with 1 μ M of 17-AAG in complete medium for the inhibition of HSP90 α / β activity in the presence or in the absence of 2 μ M MG132, 5 μ M lactacystin or 25 nM bortezomib for the inhibition of proteasome activity. Total proteins extracts from 6-well plates were used for immunoblotting. Cells cultured in 24-well plates were analysed by confocal microscopy.

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

extract were incubated with GST or GST-GABARAPL1 (prepared as previously described) bound to 100 μ l of glutathione-agarose beads in GST pull-down lysis buffer overnight at 4°C under constant agitation. After three extensive washes in PBS supplemented with 200 mM NaCl, proteins were eluted in 40 μ l of SDS-PAGE loading buffer (78 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% (w/v) SDS, 12.5% (v/v) glycerol, 6.25% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) and separated on a 10% or a 12.5% SDS-PAGE gel. After Coomassie blue staining, seven protein bands of interest were excised from the gel and analysed by mass spectrometry. To test *in vitro* binding of GABARAPL1 with HSP90 α / β , GST pull-down experiments were performed using GST-HSP90 α , GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL1 (22-117) fusion proteins (prepared as previously described) immobilized on 100 μ l glutathione-agarose beads in combination with either a rat brain protein extract (5 mg) or a HEK293 expressing GFP-HSP90 β cell lysate (1 mg) or a purified FLAG-GABARAPL1-6HIS protein (500 ng), or a human recombinant HSP90 β protein (5 μ g).

2.7. Mass spectrometry analysis

Bands of interest were excised manually from the SDS-PAGE gel and cut into 1 mm³ pieces. The gel fragments were then washed in 0.1 M ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) for 10 min and dehydrated in acetonitrile for 10 min. Dried pieces of bands were incubated in the dark successively in 10 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)/0.1 M (NH₄HCO₃) (30 min at 37 °C), acetonitrile (8 min), 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH₄HCO₃ (20 min), 0.1 M NH₄HCO₃ (2 min) and acetonitrile (8 min). Each piece of band was then digested by 20 μ l of a digestion solution (10 ng/ μ l of trypsin in 40 mM NH₄HCO₃ and 10% (v/v) acetonitrile (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, PROMEGA, V5280)) for 30 min at 4°C. Fifteen μ l of this solution was subsequently removed and 10 μ l of 40 mM NH₄HCO₃/10% (v/v) acetonitrile was added, prior to incubation at 37 °C for 2 h. Resulting peptides were concentrated on C18 (PerfectPure Eppendorf C18, 0030 008 405) according to the manufacturer's instructions. An aliquot (0.5 μ l) of the concentrate solution was then deposited onto a Ground Steel MALDI target together with 1 μ l of matrix solution (3.5 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% (v/v) acetonitrile, 0.5% (w/v) trifluoroacetic acid). Peptides were analysed by MS and MS/MS with a MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) mass spectrometer. Proteins were identified by comparison to the rat MSDB (Mass Spectrometry protein sequence DataBase) databank.

2.8. Immunoprecipitation

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

containing 0.3% (v/v) Triton X100, 1% (w/v) bovine serum albumine, 10% (w/v) skim milk and 0.01% (w/v) sodium azide at room temperature. The labeling was then revealed with a secondary goat anti-rabbit IgG conjugated Alexa Fluor-488 (1:800, Invitrogen) for 1 h at room temperature. Then, sections were incubated, under the same conditions, with the monoclonal anti-HSP90 α/β (1:400) antibody diluted in PBS containing 0.3% (v/v) Triton X100 and revealed with a donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor-555 (1:800, Invitrogen). Fluorescent sections were then observed using a confocal microscope described below.

2.11. Confocal microscopy analysis

Cells grown on coverslips were fixed in PBS-paraformaldehyde 4% (w/v) (PFA, Sigma-Aldrich, P6148) for 15 min and washed once with PBS. Cells and labeled brain sections were then analysed using a fluorescence laser scanning confocal microscope Fluoview FV1000 BX (Olympus, France). Images were obtained through a DP 75 numeric camera using the Fluoview FV1000 software (Olympus, France).

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

demonstrated an interaction between these two proteins in HEK293 cells transiently expressing GFP-HSP90 β (Fig. 2B).

Two different GST pull-down experiments utilizing either GST-GABARAPL1 and the human recombinant HSP90 β protein or GST-HSP90 α and the purified FLAG-GABARAPL1-6HIS protein demonstrated the direct interaction between GABARAPL1 and HSP90 α or HSP90 β (Fig. 2C, D). Moreover, a direct interaction between GST-GABARAP and human recombinant HSP90 β protein was also established (data not shown).

Mansuy and colleagues have demonstrated, using a deletion mutant of GABARAPL1 in a GST pull-down experiment, that the 22 amino-terminal residues of GABARAPL1 are necessary for tubulin binding [8]. In order to determine if this region of GABARAPL1 is also responsible for its interaction with HSP90 β , we subsequently tested the ability of this deletion mutant to interact with HSP90 β in a pull-down assay performed with HEK293 GFP-HSP90 β cell lysates and with the human recombinant HSP90 β protein. The intensity of the signals corresponding to GFP-HSP90 β and HSP90 β was strongly reduced when using the deletion mutant compared to the wild-type protein, showing that the amino-terminus of GABARAPL1 largely contributes to the interaction with HSP90 β (Fig. 2B, C).

All these results show that GABARAPL1 interacts with both HSP90 α and β isoforms.

3.2.2. Coimmunoprecipitation experiments.

To confirm this interaction *in vivo*, we performed an immunoprecipitation experiment using rat brain extracts and an anti-GABARAPL1 antibody (Protein Tech Group) or an anti-FLAG M2 antibody (Sigma-Aldrich) followed by Western blotting using anti-GABARAPL1 (Chemicon, Millipore) and anti-HSP90 α/β antibodies (Fig. 3). The anti-GABARAPL1 antibody from Chemicon cross-reacts with GABARAP and GABARAPL1 while the antibody from Protein Tech Group shows little to no cross-reaction with the GABARAP protein under the conditions used (data not shown). In Fig. 3, we note that the HSP90 α/β protein was coimmunoprecipitated with GABARAPL1, confirming an interaction between HSP90 α/β and GABARAPL1 in rat brain (Fig. 3A) and in MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells (Fig. 3B). Three different irrelevant antibodies (anti-rabbit GFP, anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG) were used as immunoprecipitation negative controls. The use of an anti-GABARAPL1 antibody (Chemicon, Millipore) that detects both GABARAPL1 and GABARAP for Western blot analysis showed two bands of different intensity in the brain, a higher and more intense

band corresponding to GABARAPL1 and the other one corresponding to GABARAP (Fig. 3A). This observation also suggests that GABARAP could interact with HSP90 α/β or that GABARAP was coimmunoprecipitated with GABARAPL1. In MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells, however, the GABARAPL1/HSP90 α/β interaction is indubitable given that GABARAP could not be immunoprecipitated by the anti-FLAG antibody (Fig. 3B).

3.3. GABARAPL1 colocalizes with HSP90 α/β .

3.3.1. Colocalization in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells.

Following demonstration of an *in vitro* and an *in vivo* interaction between GABARAPL1 and HSP90 α/β , we investigated the possibility of a colocalization of these two proteins in the MCF-7-Dsred-GABARAPL1 stable cell line transiently transfected with a plasmid encoding the GFP-HSP90 β protein. This stable cell line overexpresses the red fluorescent Dsred-GABARAPL1 fusion protein, which localizes to perinuclear intracytoplasmic vesicles described to be autophagosomes and lysosomes [17]. Following transfection, the GFP-HSP90 β protein was widely expressed throughout the cell, mainly in the cytoplasm, but also displayed punctate staining. Amongst these dots, a partial colocalization of GABARAPL1 with GFP-HSP90 β was clearly observed (Fig. 4A).

3.3.2. Colocalization in rat brain.

To study if this colocalization also occurs *in vivo*, we performed immunohistochemistry on rat brain sections within the dorsal retrosplenial cortex and *substantia nigra* using anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group) and anti-HSP90 α/β antibodies. The anti-GABARAPL1 antibody has been previously used in immunofluorescence staining to detect GABARAPL1 in HT29 cells [30]. These brain areas were previously described to display a strong expression of *gabapll1* mRNA [6, 7]. GABARAPL1 and HSP90 α/β were highly expressed as intracytoplasmic dots and, in agreement with the results obtained in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells, a partial colocalization was observed. Furthermore, both these proteins also presented a diffuse expression throughout the cytoplasm, where they partially colocalized (Fig. 4B).

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

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

antitumor activity in numerous animal tumor models and their effects are currently being evaluated in several clinical trials [32, 41-43].

In this work, we demonstrate that GABARAPL1 interacts directly with both HSP90 α and β isoforms as demonstrated by use of either purified GST-HSP90 α or HSP90 β proteins in GST pull-down assays and by use of an antibody directed against the two isoforms in coimmunoprecipitation experiments. In the immunoprecipitation experiment performed using rat brain extracts, an antibody directed against GABARAPL1 *versus* GABARAP was used to immunoprecipitate GABARAPL1 and an antibody recognizing the two proteins was used in immunoblot. In the brain, the GABARAP protein, although to a lesser extent than GABARAPL1, was immunoprecipitated disallowing us to exclude the possibility of an interaction between GABARAP and HSP90 α/β or between GABARAPL1 and GABARAP. However, in the MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cellular model, the specific interaction between GABARAPL1 and HSP90 α/β is confirmed with the use of an anti-FLAG antibody, which specifically immunoprecipitates GABARAPL1. Moreover, the interaction between GABARAP and HSP90 α/β was confirmed by *in vitro* pull-down experiments (data not shown) and was also observed by Behrends et al. in HEK293 cells [29]. This same study revealed, on one hand, a potential interaction between HSP90 α and/or β isoforms and all other Atg8 family members, GATE-16, LC3A, LC3B and LC3C and on the other hand, the interaction between GABARAPL1 and other HSP proteins such as HSP70, HSP60 and HSP105.

Mansuy et al. previously demonstrated that the first 22 amino-terminal residues of GABARAPL1 are implicated in tubulin binding [8]. Here, we show that the presence of this basic N-terminal region (pHi 9.6) allows for a stronger interaction between GABARAPL1 and the acidic HSP90 α/β protein (pHi 5). Distribution of both GABARAPL1 and HSP90 α/β proteins was analysed in MCF-7 stably expressing Dsred-GABARAPL1 and in two rat brain regions known to express high levels of *gabarapl1* mRNA (cortex and *substantia nigra*). Experiments performed in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells revealed a partial colocalization of Dsred-GABARAPL1 and GFP-HSP90 β in intracytoplasmic perinuclear dots. A similar partial colocalization was found in the two rat brain regions studied by immunohistochemistry.

The role of the association between GABARAPL1 and HSP90 α/β was established by the use of the HSP90 α/β activity specific inhibitor 17-AAG. Following disruption of the

interaction between the two proteins, the degradation of GABARAPL1 was demonstrated to be mediated by the proteasome as established by the use of various potent proteasome inhibitors. Interestingly, unlike GABARAPL1, GABARAP protein levels were not affected by the different treatments despite the fact that GABARAP might interact with HSP90 α/β , highlighting a major difference in the regulation of these two closely related homologues. We have demonstrated, using quantitative RT-PCR experiments an increase of the endogenous *gabarapl1* mRNA level in MCF-7 cells treated by MG132 (data not shown). Moreover, gene profiling studies of prostate cancer cells treated with MG132 and pancreatic cancer cells treated with bortezomib revealed an up-regulation of *gabarapl1* and *lc3* mRNA [44, 45]. However, in our MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS model, the rate of synthesis of the fusion protein increases independently of the transcriptional activation. On the other hand, the increase of the endogenous GABARAPL1 protein level is due to a regulation of its stability associated with a transcriptional regulation of the *gabarapl1* gene. Recent studies have demonstrated that inhibition of proteasomal degradation by specific inhibitors induces autophagy, identified by accumulation of LC3B-II, the lipidated form of LC3B that localizes to autophagosomes [46-48]. It is now obvious that these two major routes of degradation are intimately linked. In particular, impairment of degradation by the proteasome pathway causes induction of autophagy [49]. Surprisingly, no presence of the GABARAPL1-II form, already observed in cells by Chakrama et al. in autophagic conditions [17], is detectable in our experiments, suggesting that GABARAPL1 is not associated to autophagic vesicles following the inhibition of proteasomal activity. These observations therefore describe a differential regulation of GABARAPL1 and LC3B in presence of proteasome inhibitors.

Generally, prior ubiquitinylation of the majority of HSP90 α/β client proteins is required for them to be recognized and subsequently delivered to the proteasome. Some oncosuppressive client proteins, however, such as p53, display a ubiquitin-independent degradation by the proteasome [50]. Moreover, LC3B can be processed by the 20S core proteasome in a ubiquitin-independent manner *in vitro* and this degradation is inhibited by its interaction with p62, a mediator of autophagic proteolysis [51]. Whether the ubiquitinylation of GABARAPL1 is necessary to induce its degradation by the proteasome will be investigated in the future. Concerning GABARAP, Chen et al. suggest that GABARAP does not undergo the ubiquitinylation process and is not degraded through the proteasome after lactacystin treatment in rat cultured hippocampal neurons [52].

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

We are grateful to Dr. Altieri and Dr. J. Kim for kindly providing the pGST-HSP90 α and the pGFP-HSP90 β vectors. We would like to thank Fabrice Poncet, Sophie Launay (Plateformes microscopie et séquençage, IFR133, Besançon), Valérie Perez and Elodie Bôle-Richard for their technical help.

This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination InterRégionale-Grand Est), Comité du Doubs. Stéphanie Seguin-Py is supported by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. Sophie Croizier, Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn Nicole Le Grand are supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

REFERENCES

- [1] I. Pellerin, C. Vuillermoz, M. Jouvenot, C. Ordener, M. Royez, G.L. Adessi, Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells, *Mol Cell Endocrinol* 90 (1993) R17-21.
- [2] N. Le Grand, F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, GABARAPL1 (GEC1) : original or copycat?, *Autophagy* (2011) in press.
- [3] Y. Paz, Z. Elazar, D. Fass, Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p, *J Biol Chem* 275 (2000) 25445-25450.
- [4] Y. Sagiv, A. Legesse-Miller, A. Porat, Z. Elazar, GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28, *Embo J* 19 (2000) 1494-1504.
- [5] Y. Xin, L. Yu, Z. Chen, L. Zheng, Q. Fu, J. Jiang, P. Zhang, R. Gong, S. Zhao, Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein, *Genomics* 74 (2001) 408-413.
- [6] V. Mansuy-Schlick, F. Tolle, R. Delage-Mourroux, A. Fraichard, P.Y. Risold, M. Jouvenot, 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 (2006) 83-87.
- [7] F. Tolle, P.Y. Risold, V. Mansuy-Schlick, E. Rossi, M. Boyer-Guittaut, A. Fraichard, M. Jouvenot, Specific regional distribution of gec1 mRNAs in adult rat central nervous system, *Brain Res* 1210 (2008) 103-115.
- [8] V. Mansuy, W. Boireau, A. Fraichard, J.L. Schlick, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux, GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 325 (2004) 639-648.
- [9] C. Chen, J.G. Li, Y. Chen, P. Huang, Y. Wang, L.Y. Liu-Chen, GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor, *J Biol Chem* 281 (2006) 7983-7993.
- [10] Y. Chen, C. Chen, E. Kotsikorou, D.L. Lynch, P.H. Reggio, L.Y. Liu-Chen, GEC1-kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect, *J Biol Chem* 284 (2009) 1673-1685.
- [11] C. Chen, Y. Wang, P. Huang, L.Y. Liu-Chen, Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression, *J Biol Chem* 286 (2011) 15106-15115.

- [12] T. Nakamura, T. Hayashi, Y. Nasu-Nishimura, F. Sakaue, Y. Morishita, T. Okabe, S. Ohwada, K. Matsuura, T. Akiyama, PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/beta-catenin complex, *Genes Dev* 22 (2008) 1244-1256.
- [13] C. Schnack, K.M. Danzer, B. Hengerer, F. Gillardon, Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins, *Neuroscience* 154 (2008) 1450-1457.
- [14] M.G. Mameza, J.M. Lockard, E. Zamora, M. Hillefors, Z.S. Lavina, B.B. Kaplan, Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions, *J Neurochem* 103 (2007) 927-941.
- [15] C. Nemos, V. Mansuy, S. Vernier-Magnin, A. Fraichard, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux, Expression of *gec1/GABARAPL1* versus *GABARAP* mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system, *Brain Res Mol Brain Res* 119 (2003) 216-219.
- [16] A. Berthier, S. Seguin, A.J. Sasco, J.Y. Bobin, G. De Laroche, J. Datchary, S. Saez, C. Rodriguez-Lafrasse, F. Tolle, A. Fraichard, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux, F. Descotes, High expression of *gabarapl1* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer, *British journal of cancer* 102 (2010) 1024-1031.
- [17] F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, J.N. Le Grand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, *GABARAPL1 (GEC1)* associates with autophagic vesicles, *Autophagy* 6 (2010) 1-11.
- [18] V.M. Betin, J.D. Lane, Caspase cleavage of *Atg4D* stimulates *GABARAP-L1* processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis, *J Cell Sci* 122 (2009) 2554-2566.
- [19] S. Pankiv, T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, T. Johansen, *p62/SQSTM1* binds directly to *Atg8/LC3* to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *J Biol Chem* 282 (2007) 24131-24145.
- [20] K.B. Larsen, T. Lamark, A. Overvatn, I. Harneshaug, T. Johansen, G. Bjorkoy, A reporter cell system to monitor autophagy based on *p62/SQSTM1*, *Autophagy* 6 (2010) 784-793.
- [21] J.F. Rual, K. Venkatesan, T. Hao, T. Hirozane-Kishikawa, A. Dricot, N. Li, G.F. Berriz, F.D. Gibbons, M. Dreze, N. Ayivi-Guedehoussou, N. Klitgord, C. Simon, M. Boxem, S. Milstein, J. Rosenberg, D.S. Goldberg, L.V. Zhang, S.L. Wong, G. Franklin, S. Li, J.S. Albala, J. Lim, C. Fraughton, E. Llamas, S. Cevik, C. Bex, P. Lamesch, R.S. Sikorski, J. Vandenhaute, H.Y. Zoghbi, A. Smolyar, S. Bosak, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, M.E. Cusick, D.E. Hill, F.P. Roth, M. Vidal, Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network, *Nature* 437 (2005) 1173-1178.

- [22] I. Novak, V. Kirkin, D.G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F. Lohr, D. Popovic, A. Occhipinti, A.S. Reichert, J. Terzic, V. Dotsch, P.A. Ney, I. Dikic, Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance, *EMBO Rep* 11 (2010) 45-51.
- [23] F. Brischoux, D. Fellmann, P.Y. Risold, Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis, *Eur J Neurosci* 13 (2001) 1733-1744.
- [24] P.M. Schenk, S. Baumann, R. Mattes, H.H. Steinbiss, Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs, *Biotechniques* 19 (1995) 196-198, 200.
- [25] J. Mohrluder, Y. Hoffmann, T. Stangler, K. Hanel, D. Willbold, Identification of clathrin heavy chain as a direct interaction partner for the gamma-aminobutyric acid type A receptor associated protein, *Biochemistry* 46 (2007) 14537-14543.
- [26] A. Gimenez Ortiz, J. Montalar Salcedo, Heat shock proteins as targets in oncology, *Clin Transl Oncol* 12 (2010) 166-173.
- [27] P. Csermely, T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka, G. Nardai, The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review, *Pharmacol Ther* 79 (1998) 129-168.
- [28] P. Gass, H. Schroder, P. Prior, M. Kiessling, Constitutive expression of heat shock protein 90 (HSP90) in neurons of the rat brain, *Neurosci Lett* 182 (1994) 188-192.
- [29] C. Behrends, M.E. Sowa, S.P. Gygi, J.W. Harper, Network organization of the human autophagy system, *Nature* 466 (2010) 68-76.
- [30] F. Chiacchiera, A. Matrone, E. Ferrari, G. Ingravallo, G. Lo Sasso, S. Murzilli, M. Petruzzelli, L. Salvatore, A. Moschetta, C. Simone, p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription, *Cell Death Differ* 16 (2009) 1203-1214.
- [31] B.S. Blagg, T.D. Kerr, Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation, *Med Res Rev* 26 (2006) 310-338.
- [32] L. Neckers, Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents, *Trends Mol Med* 8 (2002) S55-61.
- [33] J. Lewis, A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers, Z.G. Liu, Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation, *J Biol Chem* 275 (2000) 10519-10526.

- [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.

- [47] W.X. Ding, H.M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D.B. Stolz, D. Ron, X.M. Yin, Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability, *Am J Pathol* 171 (2007) 513-524.
- [48] M. Milani, T. Rzymiski, H.R. Mellor, L. Pike, A. Bottini, D. Generali, A.L. Harris, The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib, *Cancer Res* 69 (2009) 4415-4423.
- [49] V.I. Korolchuk, F.M. Menzies, D.C. Rubinsztein, A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system, *Autophagy* 5 (2009) 862-863.
- [50] I. Jariel-Encontre, G. Bossis, M. Piechaczyk, Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome, *Biochim Biophys Acta* 1786 (2008) 153-177.
- [51] Z. Gao, N. Gammoh, P.M. Wong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, X. Jiang, Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome, *Autophagy* 6 (2010) 126-137.
- [52] Z.W. Chen, C.S. Chang, T.A. Leil, R.W. Olsen, C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking, *J Neurosci* 27 (2007) 6655-6663.

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.

Fig. 4. GABARAPL1 partially colocalizes with HSP90 α / β in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells and in rat brain.

(A) MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells were transfected by GFP-HSP90 β -expressing vector. 36 h after transfection, cells were fixed and analysed by confocal microscopy. (B) GABARAPL1 (detected with the Protein Tech Group antibody) and HSP90 α / β proteins from dorsal retrosplenial cortex or *substantia nigra* were analysed by confocal microscopy following immunohistochemistry experiments. Images were acquired at a 120x magnification. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

Fig. 5. GABARAPL1 is a client protein of HSP90 α / β .

(A) MCF-7 cells were treated with MG132 (2 μ M) or/and 17-AAG (1 μ M) for 15 h. Western blotting experiments were performed for RIP1 and tubulin. (B) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells or MCF-7 cells were treated with MG132 (2 μ M) or/and 17-AAG (1 μ M) for 15 h. Western blotting experiments were performed for GABARAPL1 (with the Chemicon antibody) and tubulin. A representative experiment of three performed is shown.

Fig. 6. GABARAPL1 degradation is inhibited by proteasome inhibitors.

(A) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with 2 μ M MG132 for 1–15 h. Western blotting was performed for GABARAPL1 (Chemicon antibody) and tubulin. (B) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with different concentrations of MG132 (0.2 μ M to 2 μ M) for 15 h. Western blotting was performed to detect GABARAPL1 (Chemicon antibody) and tubulin. (C) (D) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with different concentrations of lactacystin (0.5 μ M to 10 μ M) (C) or bortezomib (5 nM to 100 nM) (D) for 15 h. Western blottings were performed for GABARAPL1 (Chemicon antibody), tubulin and actin. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

Fig. 7. Dsred-GABARAPL1 expression in MCF-7 cells is modified following 17-AAG and MG132 treatments.

Cells (5×10^4), plated on coverslips, were treated with 17-AAG (1 μ M), MG132 (2 μ M) or both agents for 15 h. Cells were then fixed and analysed by confocal microscopy. Images were acquired at a 40x magnification. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

Table I. Mass spectrometry results for the seven bands identified by MALDI-TOF MS and/or MS/MS following GST pull-down experiments performed from total rat brain.

*: the reported theoretical MW is that of the protein in the database MSDB.

†: in MS mode, a Mascot score above 56 is significant ($p < 0.05$).

‡: precursor ions are single-charged unless stated.

§: in MS/MS mode, a Mascot score above 30 is significant ($p < 0.05$).

Figure 1

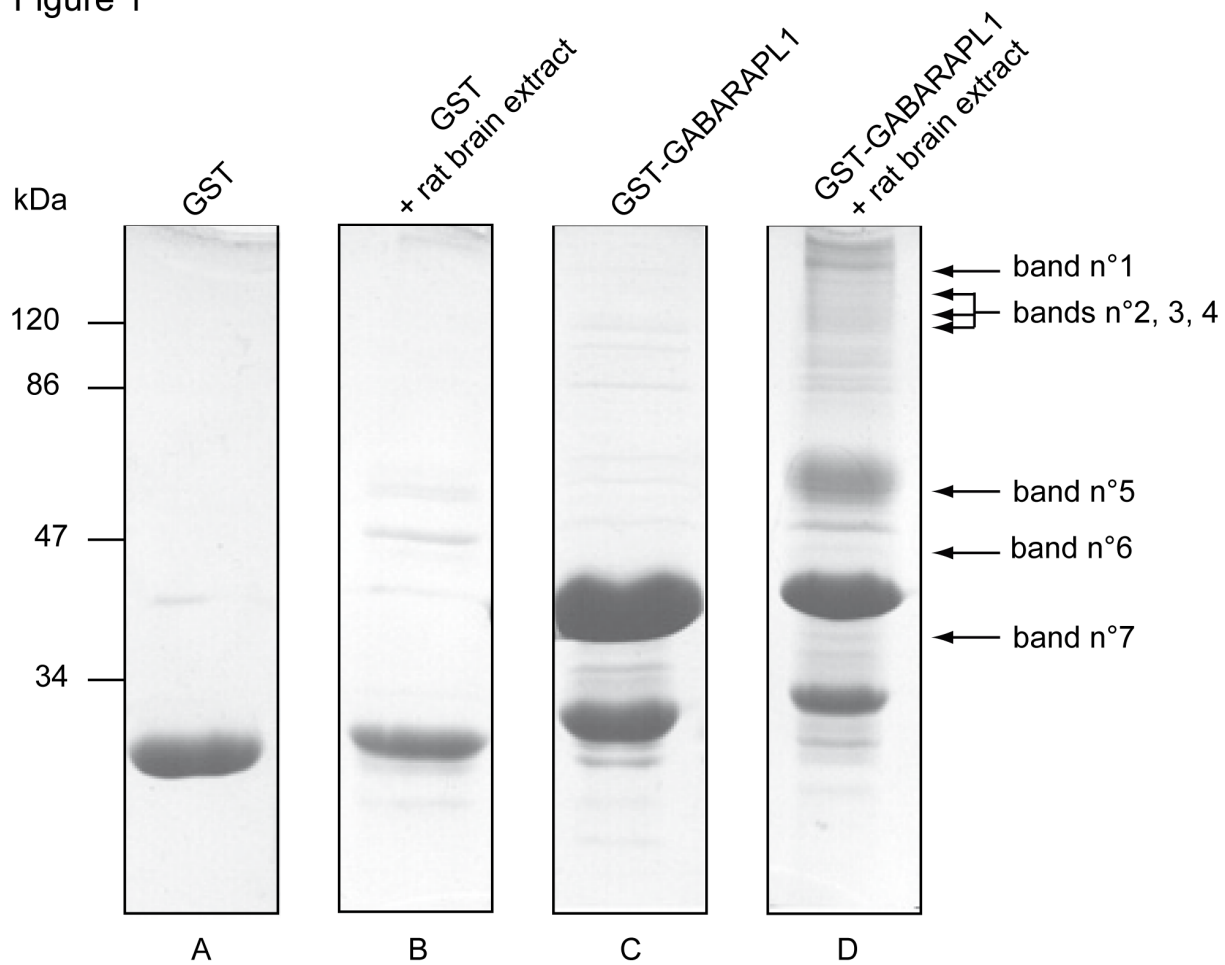


Figure 2

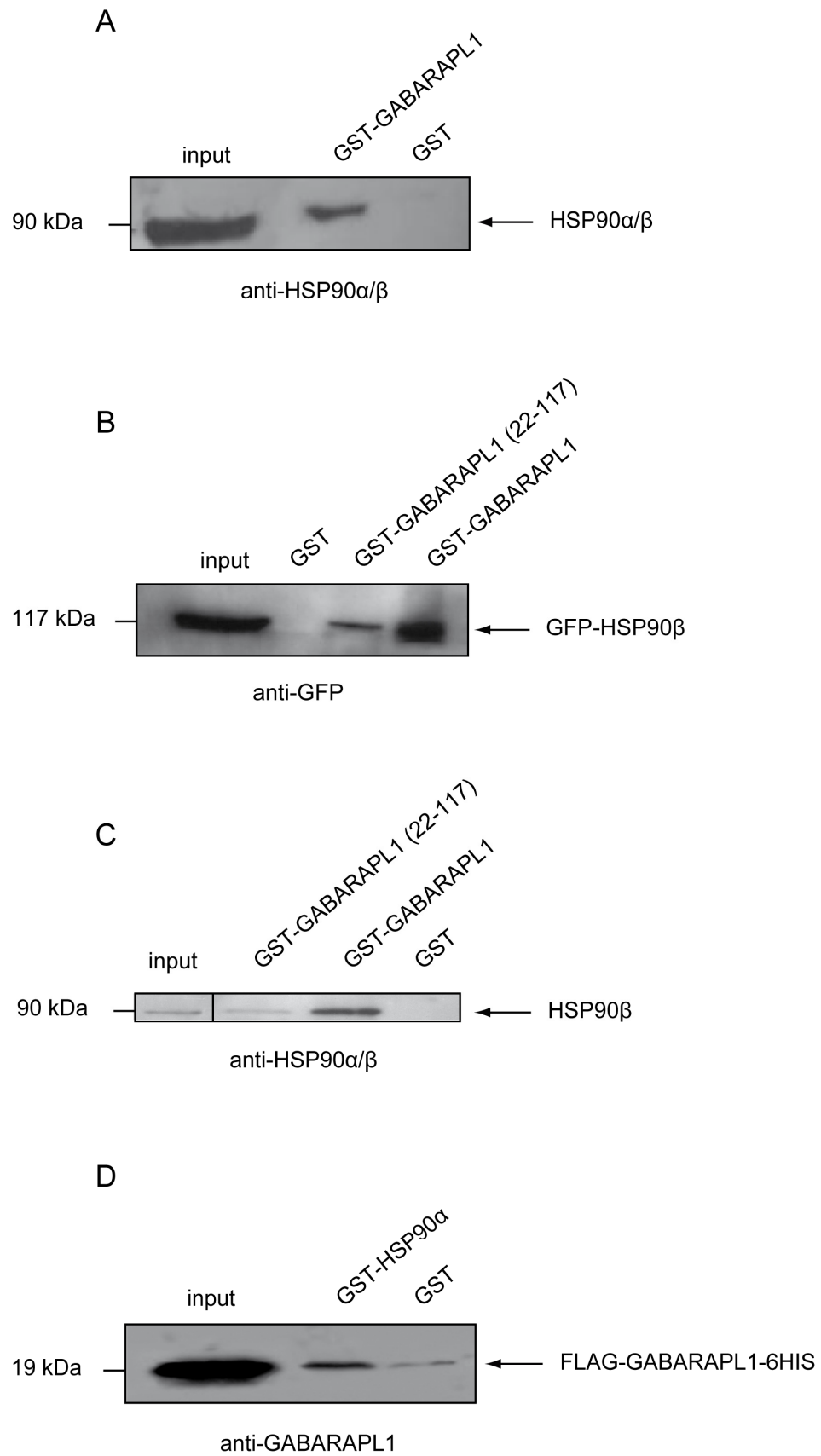


Figure 3

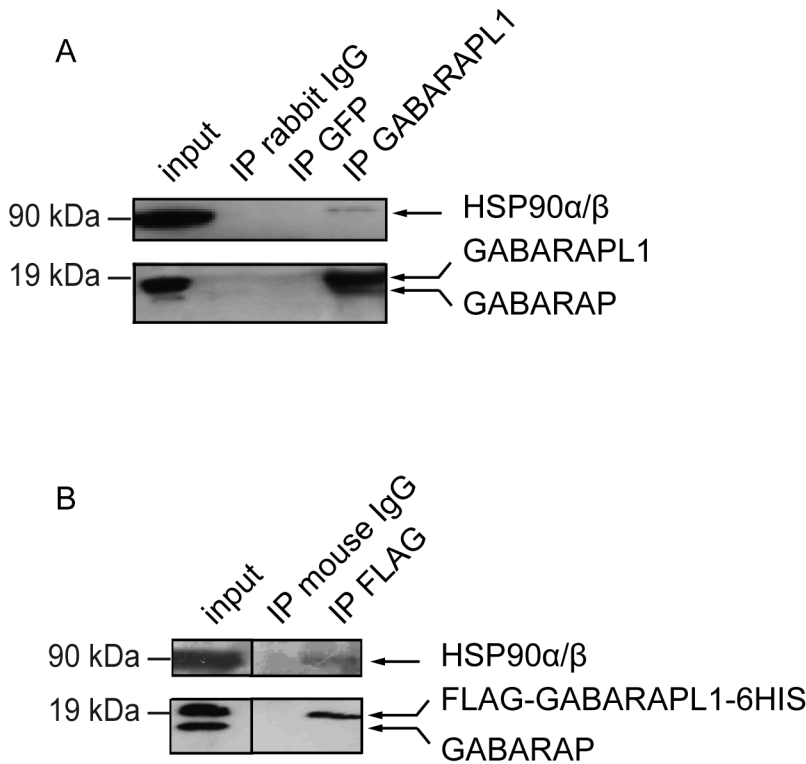
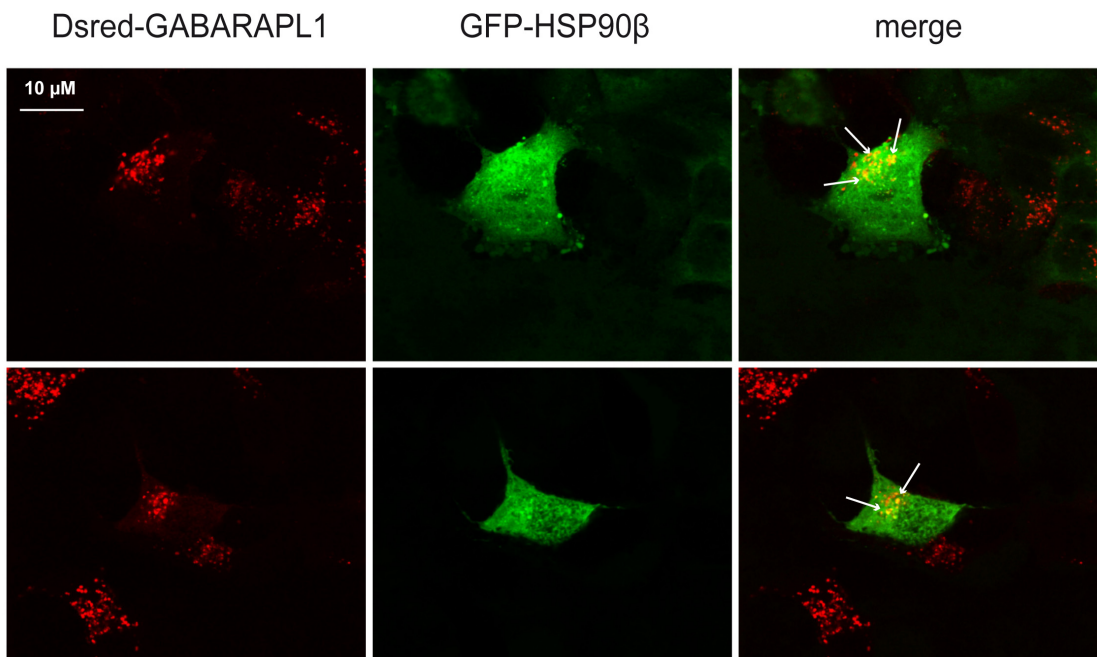


Figure 4

A



B

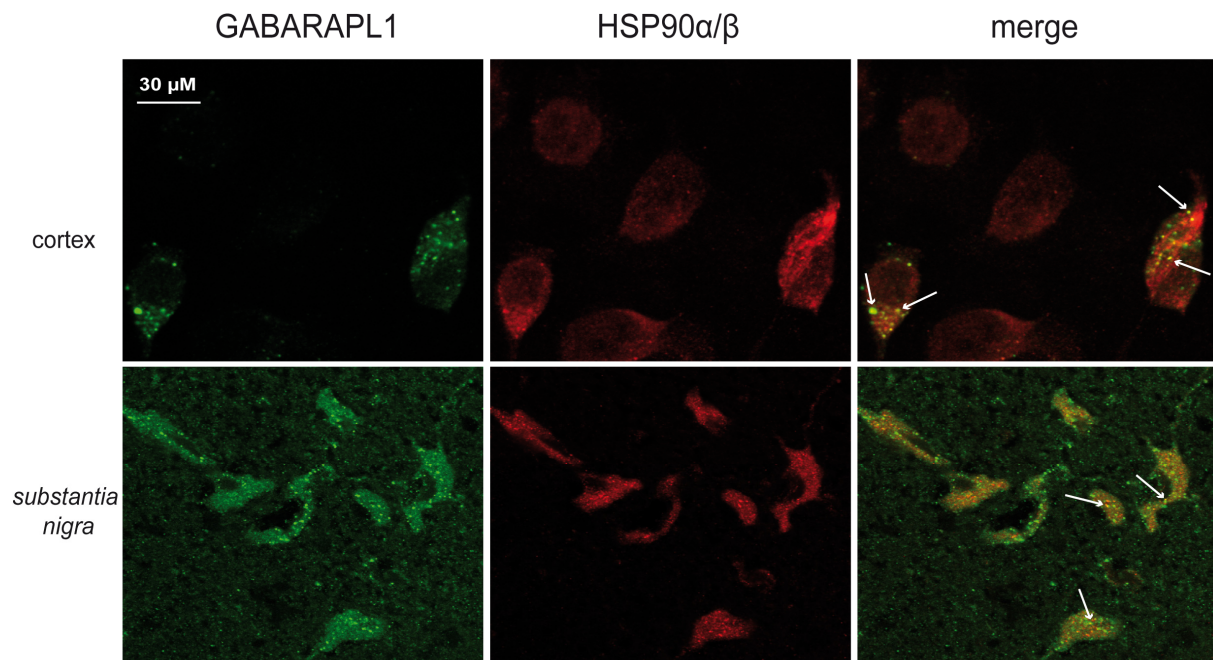


Figure 5

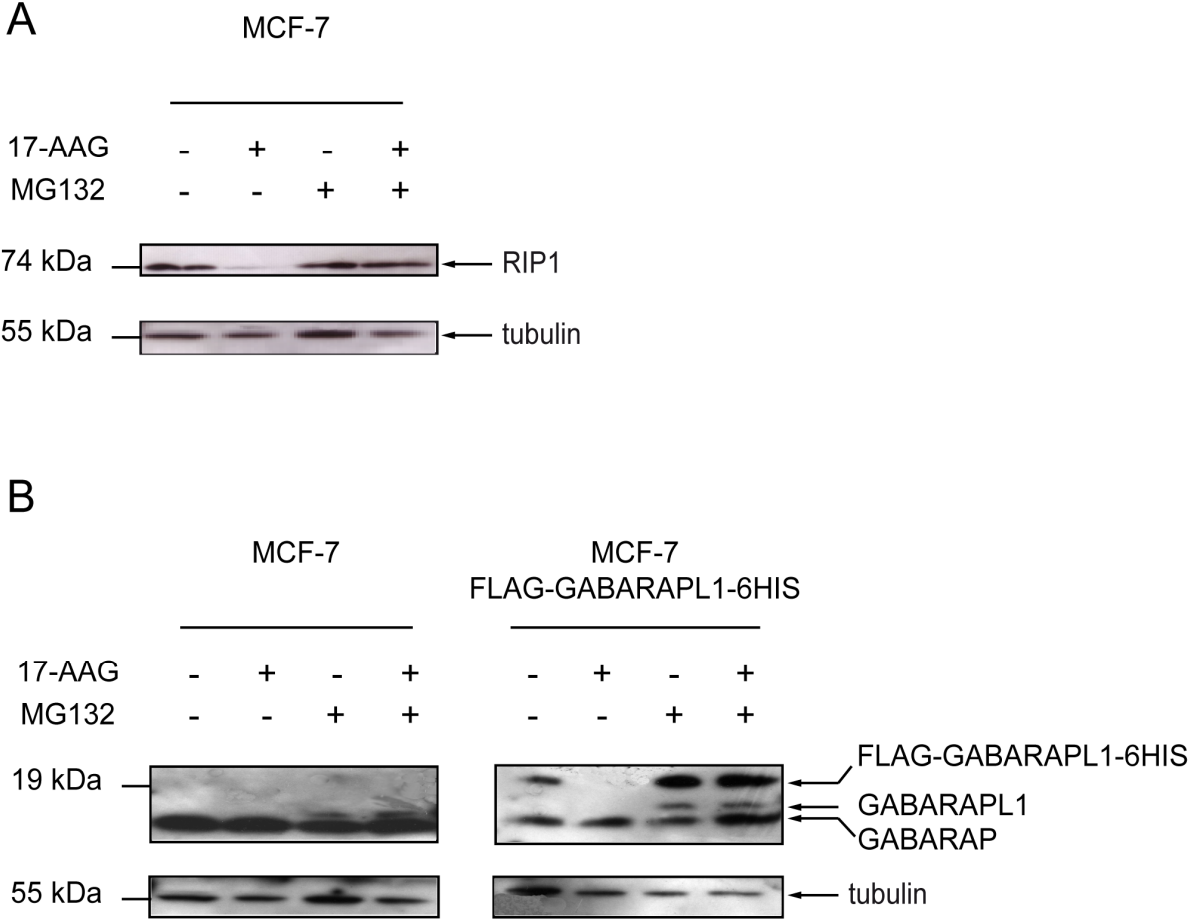


Figure 6

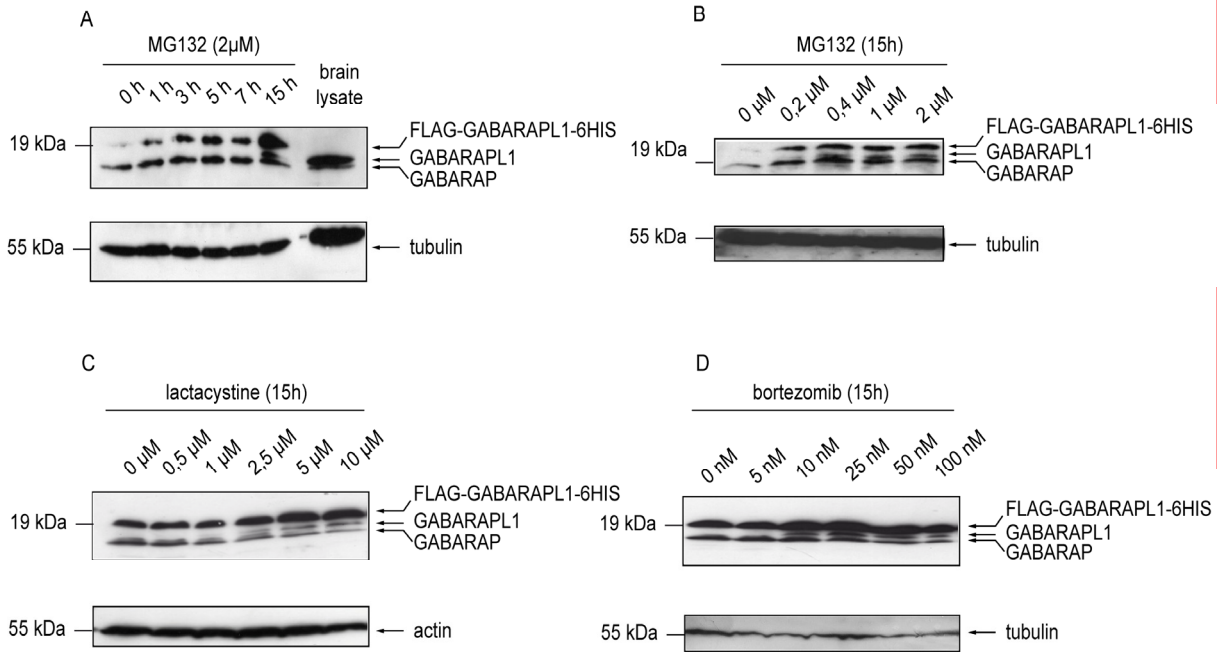
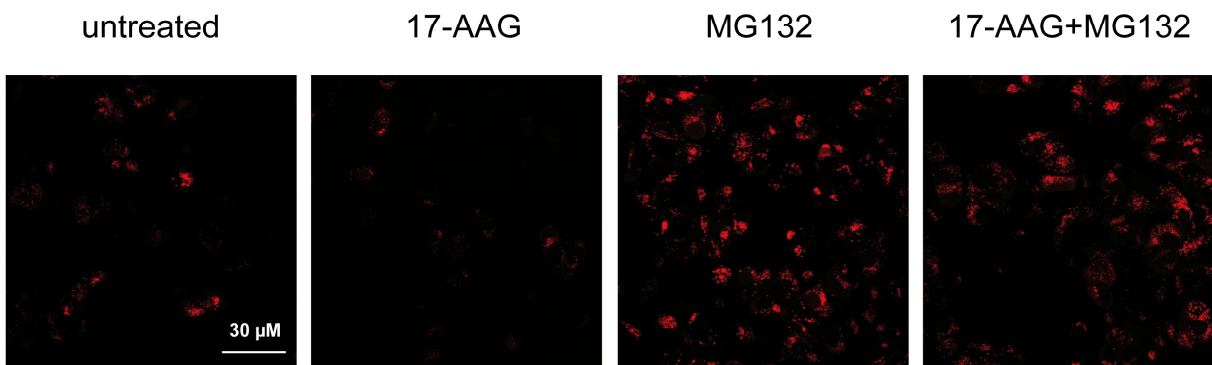


Figure 7



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	DI00 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

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Dans le but de déterminer si un effet transcriptionnel ou post-transcriptionnel peut venir s'ajouter à l'augmentation de stabilité de la protéine GABARAPL1 observée en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, nous avons traité des cellules MCF-7 par cet inhibiteur puis analysé le taux de messenger *gabarapl1* endogène par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques s'hybridant au niveau de l'UTR-3'. En parallèle, un traitement des cellules avec un inhibiteur de l'activité ATPasique de HSP90 α/β , le 17-AAG, combiné ou non avec du MG132 a été effectué. Les résultats ont été normalisés par amplification de l'ADNc *gapdh* (Figure 29). Nous avons tout d'abord constaté l'absence de signal correspondant à l'ADNc *gabarapl1* dans les cellules MCF-7 non traitées, cette observation étant en accord avec l'analyse de l'expression du messenger effectuée précédemment en RT-PCR en temps réel. Suite à l'inactivation du protéasome par le MG132, le taux d'ADNc *gabarapl1* est considérablement augmenté et un résultat similaire est obtenu lorsque les cellules ont été traitées à la fois par le 17-AAG et le MG132. Ce résultat permet de formuler deux hypothèses, soit il y a augmentation de la transcription de *gabarapl1*, soit il y a augmentation de la stabilité de l'ARNm *gabarapl1*. Par ailleurs et de manière surprenante, le taux d'ADNc *gabarapl1* est également plus important après traitement des cellules au 17-AAG soulignant une régulation inverse à celle observée au niveau protéique.

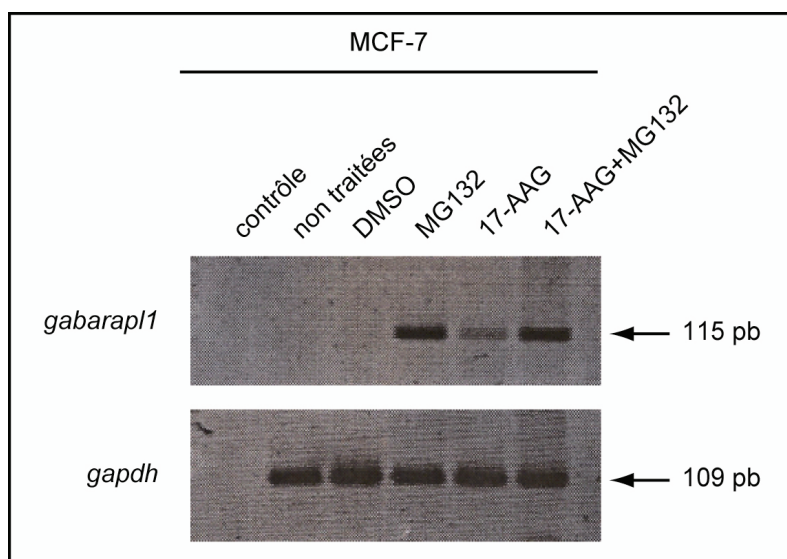


Figure 29 : Etude du taux de messagers *gabarapl1* et *gapdh* par RT-PCR dans les cellules MCF-7 traitées ou non par du 17-AAG et/ou du MG132. 17-AAG : 17-AllylAmino-17-demethoxyGeldanamycin ; MG132 : carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal.

PUBLICATION III

*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.

Autophagy (2010), 6 : 1-11.

La protéine GABARAPL1 fait partie de la famille des protéines Atg8 et plus précisément à la sous-famille GABARAP. GABARAPL1 est un orthologue de la protéine de levure Atg8 au même titre que les protéines GABARAP, GABARAPL2 et LC3. Ces protéines, au degré d'homologie plus ou moins élevé avec GABARAPL1, jouent un rôle important dans le processus d'autophagie en permettant la dégradation de protéines ou organites ainsi qu'en participant à la formation de l'autophagosome. Pour exercer leur action, ces protéines sont préalablement clivées par l'enzyme Atg4 en aval d'un résidu glycine en position C-terminale conservé chez ces protéines (Hemelaar *et al.*, 2003). Les protéines ainsi maturées sont sous une forme dénommée forme I. Elles se conjuguent ensuite à des phospholipides et sont ainsi sous une forme lipidée appelée forme II permettant leur association aux autophagosomes (Kabeya *et al.*, 2000 ; Kabeya *et al.*, 2004 ; Tanida *et al.*, 2001)

Etant donné l'appartenance de GABARAPL1 à la famille Atg8 ainsi que la présence d'un résidu Gly¹¹⁶ dans sa séquence, une possible implication de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie a été envisagée par des membres de notre équipe (Chakrama, 2011). Nous avons donc cherché à savoir si la protéine GABARAPL1 pouvait également être clivée, conjuguée à des phospholipides et associée à des autophagosomes dans différents modèles cellulaires.

J'ai participé à ces travaux de recherche en créant successivement les constructions plasmidiques pSBet *flag-gabarapl1-6his*, pcDNA5/FRT *flag-gabarapl1-6his*, pcDNA3.1 *flag-gabarapl1-6his*, pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pDsred-GABARAPL1 et les lignées cellulaires stables HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS et MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS. Le vecteur pDsred-GABARAPL1 a permis l'établissement des lignées stables HEK293 Dsred-GABARAPL1 et MCF-7 Dsred-GABARAPL1.

Ces recherches font l'objet de la **publication III** et ont permis de montrer que :

- **GABARAPL1 est clivée dès sa synthèse par l'enzyme Atg4B, conduisant à la formation de GABARAPL1-I.**
- **GABARAPL1 est conjuguée à des phospholipides après induction de l'autophagie ou après inhibition de l'activité lysosomale, aboutissant à la formation de GABARAPL1-II.**
- **la forme GABARAPL1-II est localisée exclusivement dans les fractions membranaires des cellules HEK293 FLAG-GABARAPL1-6HIS.**

- GABARAPL1 est localisée dans des vésicules intracytoplasmiques où elle co-localise partiellement avec la protéine LC3, suite à l'induction de l'autophagie.

La nature des vésicules intracytoplasmiques a été recherchée à l'aide d'un marqueur des lysosomes et de cellules MEF Atg5^{-/-} incapables de former des autophagosomes. Ces expériences ont permis de montrer que :

- GABARAPL1 est localisée partiellement au niveau de lysosomes ainsi qu'au niveau d'autophagosomes.

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 (gac1) 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 *gac1* (*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 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 GABARAPL1 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 GABARAPL1 might be implicated in the autophagic process as well.

Here we report data demonstrating that GABARAPL1 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 GABARAPL1 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 GABARAPL1 in autophagy.

Results

GABARAPL1 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 GABARAPL1 shares a high identity with these proteins, we hypothesized that GABARAPL1 may also undergo cleavage to free the glycine 116 (Gly116) and produce the mature form of the protein, GABARAPL1-I.

To do so, we designed two different vectors encoding GFP fused to the N-terminus of GABARAPL1 (GFP-GABARAPL1) or the C-terminus of GABARAPL1 (GABARAPL1-GFP). When these proteins were expressed in HEK293 cells, we detected the GFP-GABARAPL1 protein at the expected size of 44 kDa using either the GFP or GABARAPL1 antibody (Fig. 1A, lanes 2 and 6). However when the GABARAPL1-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-GABARAPL1 antibody which produced only one signal at 16 kDa (Fig. 1A, lane 7). These data demonstrate that the GABARAPL1-GFP protein is cleaved in the cells into two peptides, GFP and GABARAPL1. To investigate whether the glycine 116 was the site of cleavage in GABARAPL1, we created a vector encoding the GABARAPL1-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 GABARAPL1-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 GABARAPL1 protein in the cells.

GABARAPL1 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 GABARAPL1 is linked to phospholipids in the cells and exists as the modified protein GABARAPL1-II, we used a HEK293 stable cell line expressing the GABARAPL1 protein fused to the Flag epitope at its N-terminus and six histidine residues at its C-terminus, Flag:GABARAPL1:6 his.

To enrich and detect the modified form of Flag:GABARAPL1:6 his (Flag:GABARAPL1-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:GABARAPL1-II form of the protein.

When untreated HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cell lysates were probed with an antibody against GABARAPL1, we detected two signals at 16 and 19 kDa (Fig. 2A and B, lanes 1), corresponding to the mature GABARAP-I and GABARAPL1-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 GABARAPL1-expressing vectors showed that

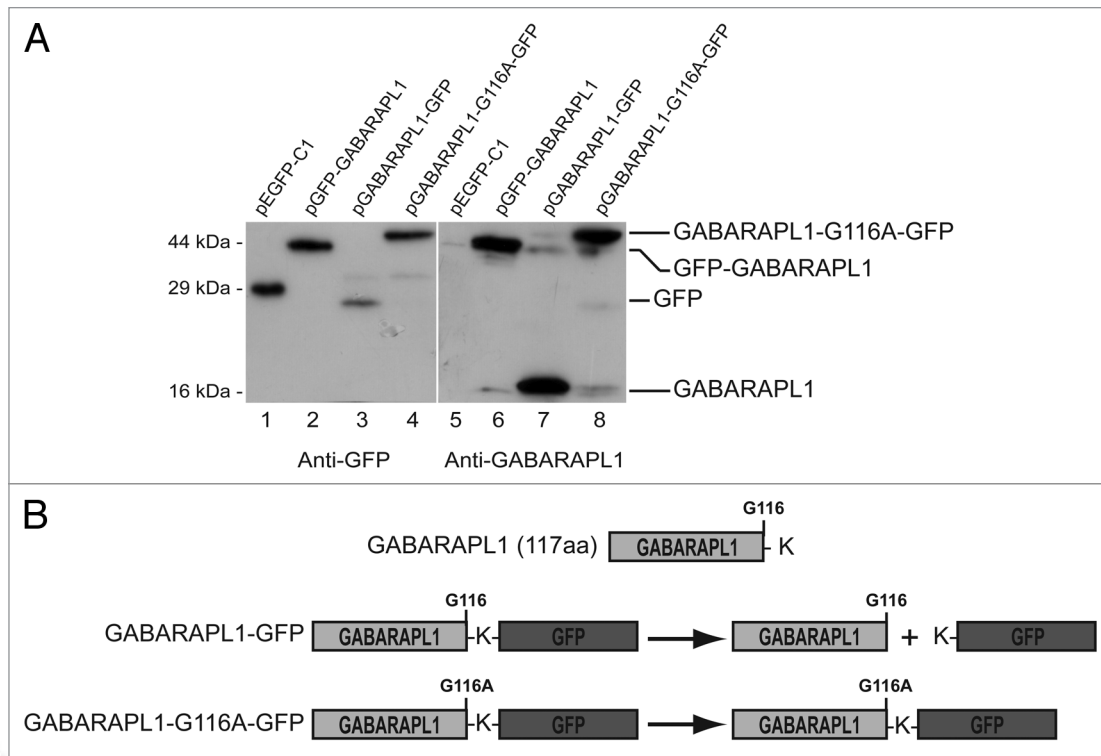


Figure 1. GABARAPL1 is cleaved in cells at the glycine 116 residue to produce a mature form of the protein. (A) HEK293 cells were transfected with the pEGFP-C1, pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP, vectors. After 48 h, cells were lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE 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

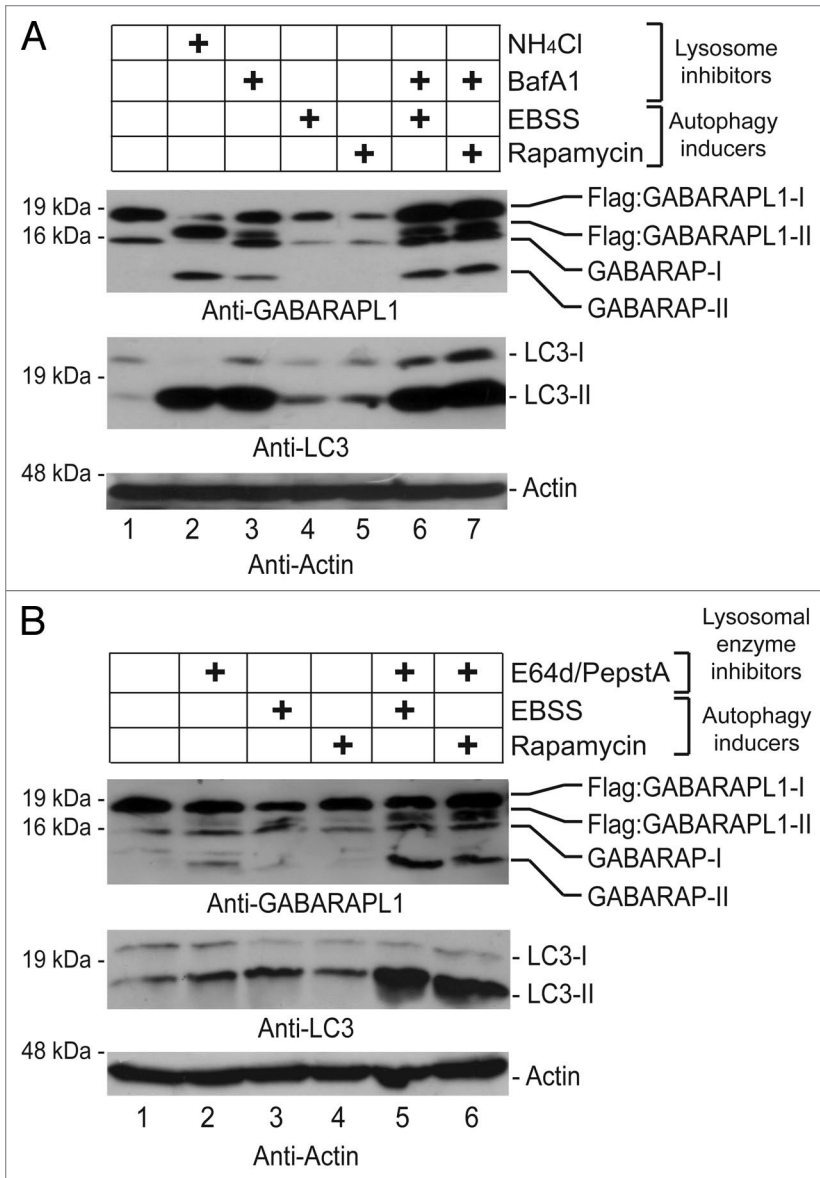


Figure 2. GABARAPL1 is conjugated to phospholipids in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in the presence or absence of autophagy inducers (10 μ M Rapamycin or EBSS for 4 h) with or without (A) a lysosome inhibitor (200 nM Bafilomycin A1 for 16 h) or (B) lysosomal enzyme inhibitors (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-GABARAPL1, 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:GABARAPL1-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 GABARAPL1 protein to allow its further recycling and confirm that GABARAPL1 is linked onto phospholipids in the cells.

The GABARAPL1-II form is associated with membranes in the cells. To determine whether the lipidated form of GABARAPL1 (GABARAPL1-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:GABARAPL1:6 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 GABARAPL1 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

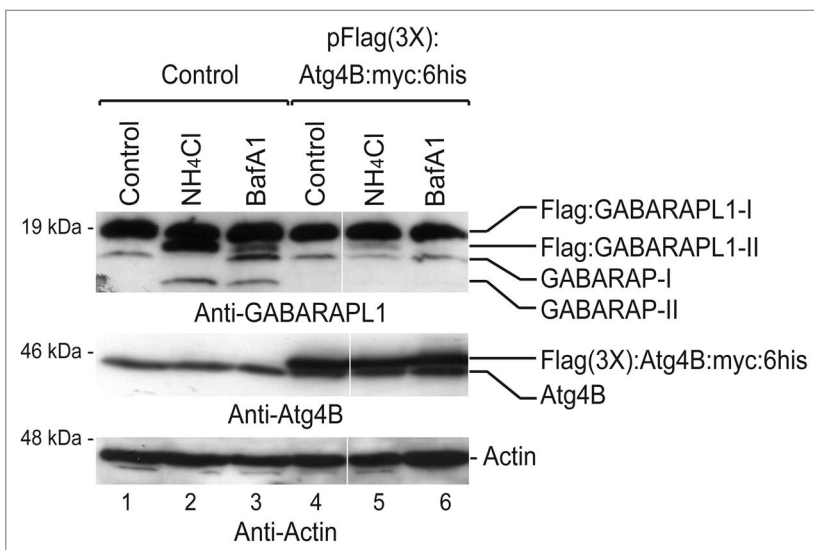


Figure 3. Atg4B delipidates GABARAPL1 in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were transfected with a control (pcDNA3.1) or an Atg4B-expressing vector (pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:MyC:6 his). 48 h after transfection, cells were cultured in 50 mM NH₄Cl for 2 h or 500 nM Bafilomycin A1 for 24 h. Cells were then lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAPL1, 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

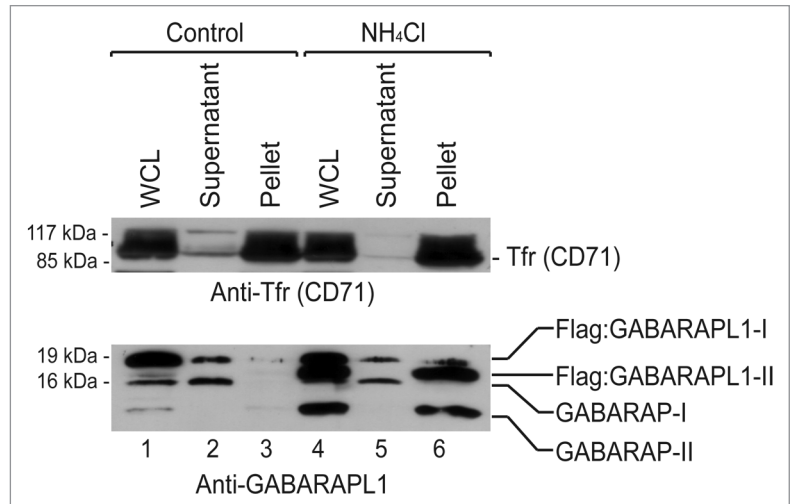


Figure 4. The GABARAPL1-II form is associated with membranes in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in complete medium or DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH_4Cl for 2 h. Cells were then collected in PBS supplemented with 1 mM PMSF, washed, homogenized (WCL, Whole Cell Lysates) 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.

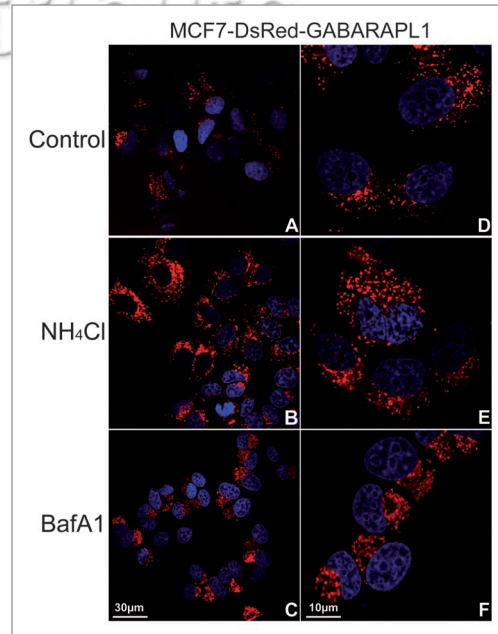


Figure 5. Inhibition of lysosomal activity results in the accumulation of GABARAPL1-positive intracytoplasmic vesicles. MCF-7 cells overexpressing the DsRed-GABARAPL1 protein were incubated in complete medium (Control) (A and D), DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH_4Cl for 2 h (NH_4Cl) (B and 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.

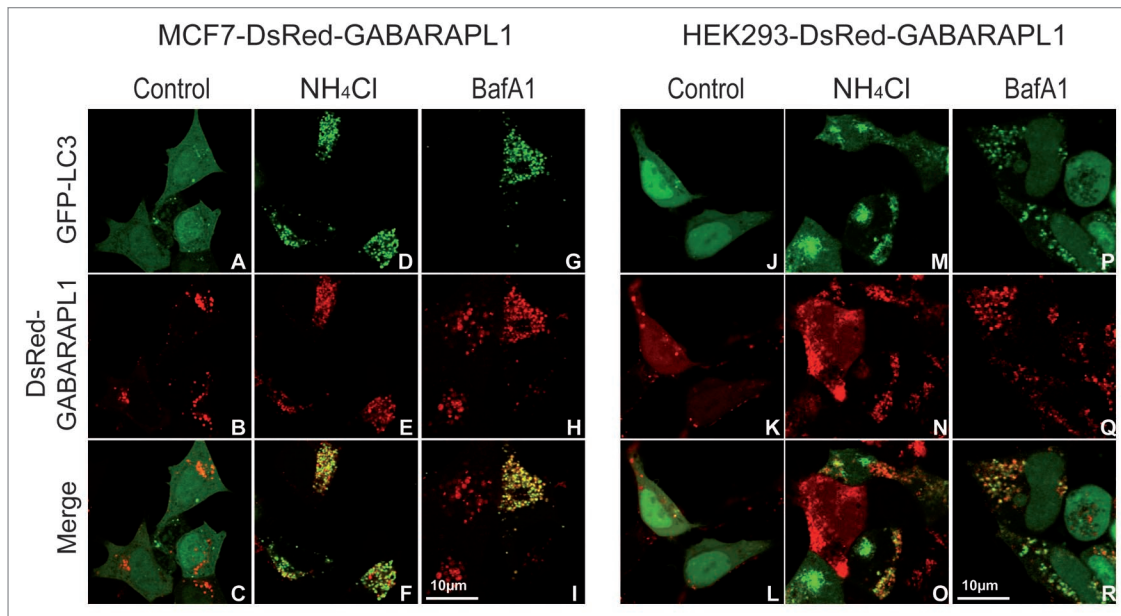


Figure 6. GABARAPL1 partially colocalizes with LC3 in the cells. MCF7- (A–I) or HEK293-DsRed-GABARAPL1 (J–R) cells were transfected with the pGFP-LC3 vector in Lab-Tek™II chambers. 48 h after transfection, cells were incubated with 50 mM NH_4Cl for 2 h (D–F, M–O) or 500 nM Baflomycin A1 for 24 h (G–I, 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

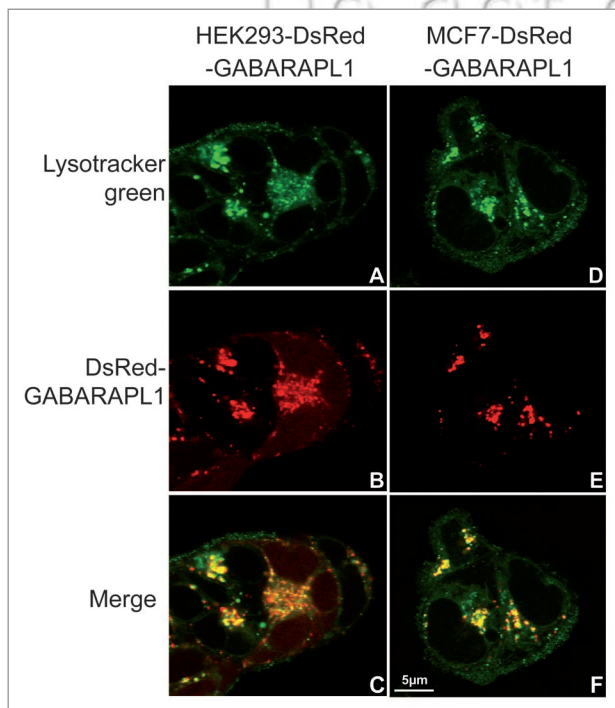


Figure 7. GABARAPL1 is partially localized in lysosomes in the cells. HEK293- (A–C) or MCF7-DsRed-GABARAPL1 (D–F) cells were grown in Lab-Tek™II chambers for 24 h. Cells were then incubated in complete medium supplemented with 50 nM Lysotracker green for 1 h and living cells were analyzed by confocal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

HEK293. When we treated the cells with NH_4Cl or Baflomycin A1 (Fig. 6D, G, M and P), we observed an almost complete relocalization 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 G). 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.

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

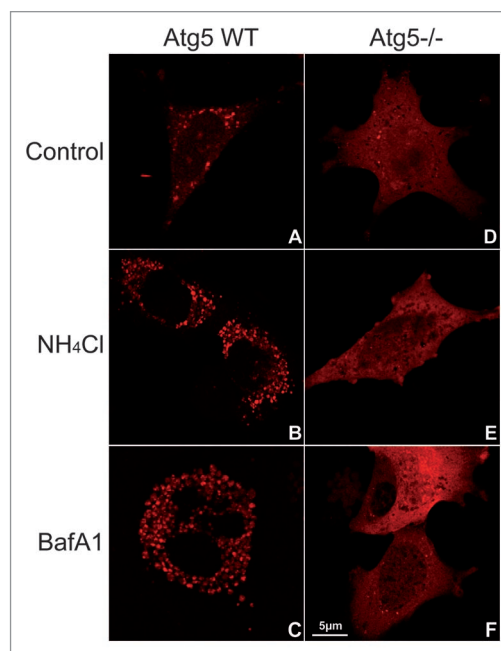


Figure 8. Intracellular punctate GABARAPL1 staining is abolished in Atg5^{-/-} MEFs. WT (A–C) and Atg5^{-/-} (D–F) MEF cells were transfected with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector. 48 h after transfection, cells were incubated in complete medium (A and B), with 50 mM NH_4Cl for 2 h (B and E) or 500 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, Scherneck 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.

DISCUSSION
CONCLUSION
PERSPECTIVES

Mon projet de thèse s'inscrivait dans la thématique de l'équipe « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central ». Dans un premier temps, j'ai ainsi eu pour but d'étudier l'expression du gène *gabarapl1* dans différents types de cancers et en particulier dans le cancer du sein en utilisant un modèle cellulaire surexprimant la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS. Dans un second temps, j'ai également pu identifier de nouveaux partenaires potentiels de GABARAPL1 avec plus spécialement la mise en évidence de l'interaction de GABARAPL1 avec la protéine de choc thermique HSP90 β dans le cerveau et dans les cellules MCF-7. La découverte de cette interaction m'a alors incitée à m'intéresser à la stabilité de la protéine GABARAPL1 et nous avons pu ainsi démontrer la dégradation de GABARAPL1 par la voie du protéasome. J'ai par ailleurs participé à la publication des travaux de Fatima Zahra Chakrama relatifs à l'étude du rôle de la protéine GABARAPL1 dans le processus d'autophagie.

- ***Gabarapl1* et cancer du sein**

Dans notre laboratoire, la diminution voire la perte d'expression de *gabarapl1*, et dans une moindre mesure de *gabarap*, a été rapportée pour la première fois dans des lignées cancéreuses, ouvrant ainsi la porte à une nouvelle voie de recherche (Nemos *et al.*, 2003). Afin de mieux comprendre la relation existant entre *gabarapl1* et cancer, nous avons choisi d'étendre l'étude de l'expression de *gabarapl1* à des tissus cancéreux. En parallèle, l'expression de *gabarap* a également été étudiée. A l'aide d'un système en macro-array, nous avons pu observer des variations d'expression positives ou négatives dans certains tissus et en particulier dans le sein où l'expression de *gabarapl1* est diminuée. L'analyse du profil d'expression de *gabarapl1* et de *gabarap* dans plusieurs lignées de cancer humain (HeLa, Daudi, K562, HL-60, G-361, A549, MOLT-4, SW480, Raji, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-549, ZR-75-1) a confirmé cette faible expression de l'ARNm *gabarap* et particulièrement de l'ARNm *gabarapl1*, mis à part pour la lignée MDA-MB-436. Des modifications épigénétiques éventuelles pouvant expliquer une perte d'expression du gène *gabarapl1* dans les cellules cancéreuses, tels que l'hyperméthylation du promoteur au niveau d'îlots CpG, abondants dans l'UTR5' de *gabarapl1*, ou encore la désacétylation des histones, seront prochainement étudiées. Au niveau protéique, GABARAPL1 est détectée uniquement dans la lignée MDA-MB-436 alors que GABARAP est exprimée dans toutes les lignées suggérant une régulation différente de ces deux homologues. Les cellules MDA-MB-436 n'expriment pas les récepteurs RE, RP et HER2, ont un faible pouvoir tumorigène après

injection dans des souris immuno-déficientes et présentent une mutation de la protéine p53. A l'heure actuelle, nous ne pouvons cependant pas expliquer l'expression plus importante de *gabarapl1* observée dans cette lignée par les caractéristiques propres à ces cellules telles que le statut hormonal ou le sous-type moléculaire.

Cette étude a été complétée par l'évaluation de l'effet de la surexpression de la protéine GABARAPL1 dans des cellules MCF-7. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une forte expression de GABARAPL1 est corrélée à une diminution de la prolifération cellulaire et à une capacité réduite à former des colonies sur agar mou. Néanmoins, ces résultats n'ont pas pu être confirmés *in vivo* par suivi de la croissance tumorale suite à une xénogreffe de ces cellules chez des souris immuno-déficientes.

Il était donc nécessaire d'étudier l'effet de la surexpression de GABARAPL1 dans d'autres lignées de cancers du sein aux caractéristiques différentes. Une seconde lignée de cancer du sein exprimant peu l'ARNm *gabarapl1* mais plus agressive *in vivo*, la lignée MDA-MB-231, dans le but de déterminer si des effets comparables à ceux observés dans les cellules MCF-7 pouvaient également être observés dans cette lignée. La lignée est actuellement en cours de caractérisation, dans notre laboratoire, par Fatima-Zahra Chakrama. En parallèle, le modèle cellulaire MDA-MB-436 est particulièrement intéressant du fait qu'il présente un niveau d'expression plus élevé de l'ARNm et de la protéine GABARAPL1 par rapport aux autres lignées de cancer du sein humain. L'expression de l'ARNm *gabarapl1* a été ainsi inhibée de façon stable dans ces lignées à l'aide de shRNA de manière à déterminer l'impact de cette surexpression sur leur prolifération et leur croissance en agar mou. La lignée est actuellement en cours de caractérisation au laboratoire.

Par ailleurs, en collaboration avec le Docteur Françoise Descotes, nous avons montré qu'une forte expression de *gabarapl1* représentait un facteur de bon pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein de différents types histologiques et de différents grades avec atteinte ganglionnaire. De plus, des facteurs pronostiques (taille de la tumeur, statut hormonal, envahissement ganglionnaire) ont pu être associés pour la première fois à l'expression de *gabarapl1*. La recherche de l'expression de *gabarapl1* et de son impact pronostique sera étendue à d'autres types de cancers et des études ont d'ores et déjà débutées à partir de tumeurs de vessie et de rein. Par l'utilisation du système en macro-array, nous avons pu observer que l'expression de *gabarapl1* dans les cancers de vessie est également diminuée par rapport aux tissus normaux correspondants alors que son expression dans les

cancers rénaux varie entre les différents patients. De plus, une diminution de l'expression de *gabap11* a été observée dans des tumeurs de vessie à un stade avancé par une étude en micro-array réalisée à partir de 105 tumeurs (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2006).

Nous avons ainsi pu montrer que l'expression de *gabap11* est régulée dans les cancers du sein et que son expression est clairement associée à une diminution du risque de récurrence des patientes. L'ensemble de ces données suggère que *gabap11* pourrait constituer un nouveau gène suppresseur de tumeurs dans les cancers du sein au même titre que les gènes codant les protéines BRCA1 (Miki *et al.*, 1994), BRCA2 (Thorslund and West, 2007), p53 (Borresen-Dale, 2003), RB (Retinoblastoma Protein) (Nielsen *et al.*, 1999), PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) (Salmena *et al.*, 2008) ou c-kit (Natali *et al.*, 1992). Les gènes suppresseurs de tumeurs sont altérés précocement au cours de la progression tumorale par, la plupart du temps, inactivation de leurs deux allèles et ils sont répartis en deux catégories en fonction de leur mécanisme d'action : soit ils freinent la prolifération cellulaire en inhibant la progression du cycle cellulaire et/ou en induisant l'apoptose, soit ils participent directement à la réparation de l'ADN (Kinzler and Vogelstein, 1997). *Gabap11* pourrait donc appartenir à la catégorie de gènes suppresseurs de tumeurs responsables du ralentissement de la croissance cellulaire.

De plus, *gabap11* est régulé positivement par les facteurs de transcription de la famille FoxO dont les gènes cibles codent des protéines notamment impliquées dans la mort cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire, la suppression tumorale, l'autophagie ou la résistance au stress cellulaire (Accili and Arden, 2004 ; Greer and Brunet, 2005 ; Salih and Brunet, 2008). Des travaux récents ont montré que les gènes FoxO, et en particulier FoxO3a, sont eux mêmes considérées comme des gènes suppresseurs de tumeurs même si aucune mutation de ces gènes n'a pu être mise en évidence jusqu'à présent. De nouveaux traitements anti-cancéreux combinant des composés chimiothérapeutiques administrés classiquement comme le 4-hydroxytamoxifène ou le paclitaxel et des inhibiteurs de kinases, responsables de phosphorylations inhibitrices de FoxO comme AKT, IKK ou ERK, permettent l'activation de FoxO ce qui potentialise l'effet bénéfique du traitement. La protéine FoxO3a peut être ainsi activée dans différents types de cancer comme les leucémies, les glioblastomes ou les cancers de la prostate et du sein (Paik *et al.*, 2007 ; Yang and Hung, 2011 ; Yang and Hung, 2009). La surexpression de FoxO3a inhibe la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* dans des cellules de cancers du sein MDA-MB-231, MDA-MB-453 et MDA-MB-435 (Hu *et al.*, 2004 ; Yang *et*

al., 2008). De plus, une localisation cytoplasmique de FoxO3a est corrélée à un mauvais pronostic de survie chez des patientes atteintes de cancer du sein (Hu *et al.*, 2004). Les traitements anti-cancéreux entraînant l'activation de FoxO pourraient donc en même temps permettre l'induction de *gabarapl1* renforçant l'hypothèse d'une implication de ce gène dans les cancers du sein.

Par ailleurs, d'autres données ont suggéré un rôle de *gabarap* dans des cancers de diverses origines : dans les neuroblastomes et les cancers colorectaux où l'expression de *gabarap* est corrélée à un facteur de bon et mauvais pronostic respectivement (Miao *et al.*, 2010 ; Roberts *et al.*, 2004), dans les cellules de cancer du sein CAL51 présentant un faible taux de GABARAP et où sa surexpression aboutit à la restauration du phénotype normal (Klebig *et al.*, 2005) et dans des adénomes et des tumeurs de la thyroïde où l'expression de GABARAP est augmentée (Roberts *et al.*, 2009).

L'étude de l'impact de la surexpression de GABARAPL1 dans d'autres lignées cellulaires a donc été envisagée. La surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS a été effectuée dans une lignée de cellules non cancéreuses, la lignée HEK293, issue d'un autre organe que le sein. A l'inverse des cellules MCF-7, la surexpression conduit à l'augmentation de la croissance des cellules HEK293. Le mécanisme moléculaire mis en jeu n'a pas été élucidé à ce jour même si un lien avec le rôle de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie a été suggéré. Au cours de sa thèse, Fatima-Zahra Chakrama a mis au point un modèle cellulaire stable HEK293 FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS exprimant la protéine GABARAPL1 mutée au niveau du résidu glycine 116 en alanine auquel j'ai participé en générant le vecteur pcDNA5/FRT *flag-gabarapl1-G116A-6his*. Cette mutation inhibe la maturation de la protéine GABARAPL1 ainsi que sa liaison aux phospholipides mais son implication sur le phénotype des cellules n'a pas été clairement déterminée jusqu'à présent.

Dans l'optique d'établir une éventuelle corrélation entre l'expression de *gabarapl1* et le type et/ou le grade histologique des cancers du sein, nous étudierons l'expression de *gabarapl1* dans des tumeurs de sein de diverses origines et de différents grades. Une étude préliminaire a été réalisée à partir de dix tumeurs de sein obtenues auprès du CGFL (Centre Georges François Leclerc) à Dijon. Ces tumeurs étaient de grade I ou III et étaient représentatives de quatre des cinq sous-types moléculaires existants : luminal A, luminal B, basal et HER2 avec, au sein du sous-type HER2, une distinction entre les tumeurs exprimant

les récepteurs hormonaux (HER2/RH+) et celles ne les exprimant pas (HER2/RH-). Ainsi, nous disposions de deux tumeurs pour chacun des sous-types luminal A, luminal B et basal, de deux tumeurs HER2/RH+ et de deux tumeurs HER2/RH-, et seules les tumeurs de sous-type luminal A étaient de grade I. Disposant désormais au laboratoire d'un anticorps plus spécifique de la protéine GABARAPL1 (Groupe Protein Tech), l'analyse de l'expression de GABARAPL1 a été évaluée directement au niveau de la protéine par western blotting. Une expression hétérogène de la protéine GABARAPL1 a pu être observée et aucune corrélation n'a pu être établie étant donné le faible nombre de tumeurs. La collecte d'un nombre plus élevé de tumeurs est donc nécessaire pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement analysables. En parallèle, en collaboration avec la plateforme CLIPP (Clinical and Innovation Proteomic Platform) de Dijon, une analyse du protéome de ces échantillons tumoraux est actuellement réalisée par spectrométrie de masse. Nous espérons que cette étude protéomique pourra permettre, d'une part, d'associer l'expression de GABARAPL1 à d'autres protéines déjà marqueurs ou non des différents sous-types de cancers du sein et d'autre part, d'identifier d'éventuelles formes modifiées de GABARAPL1 comme des produits de clivage.

L'expression du messager *gabapapll* a été également étudiée au laboratoire, dans le cadre de la thèse de Fabrice Tolle, dans des tumeurs du système nerveux central, les méningiomes. Une expression différentielle de *gabapapll* dans des méningiomes de grade I a été observée et ces variations peuvent être corrélées au type histologique de méningiomes, au sexe et à l'âge des patients (Tolle, 2008). Cette étude préliminaire a été poursuivie au laboratoire au niveau protéique dans d'autres méningiomes de grade I. Les résultats obtenus ont mis en évidence une expression hétérogène de GABARAPL1 et confirment en partie les résultats obtenus au niveau du messager. Ainsi, une faible expression de GABARAPL1 a été observée dans les méningiomes psammomateux et l'expression de GABARAPL1 diminue avec l'âge des patientes (Chakrama, 2011). Cette analyse sera poursuivie sur 40 échantillons supplémentaires.

- ***Gabapapll* et autophagie**

Récemment, dans le cadre de la thèse de Fatima-Zahra Chakrama, il a été établi au laboratoire que GABARAPL1 pouvait être maturée, pouvait s'associer à des phospholipides et était partiellement localisée au niveau d'autophagosomes et de lysosomes dans le cytoplasme des cellules HEK293 et MCF-7, suggérant pour la première fois un rôle de

GABARAPL1 dans le processus d'autophagie (Chakrama *et al.*, 2010). Ainsi, GABARAPL1 pourrait, de la même manière que GABARAP et GATE-16, être impliquée dans des étapes plus tardives de la formation de l'autophagosome et spécialement dans sa fermeture (Weidberg *et al.*, 2010). Simultanément à l'obtention de ces résultats, Betin et collaborateurs ont également mis en évidence une maturation spécifique à GABARAPL1 par l'enzyme Atg4D au préalable clivée par la caspase 3. Atg4D possède par ailleurs un domaine BH3 dans sa partie C-terminale et peut être recrutée au niveau de la mitochondrie pour déclencher l'apoptose (Betin and Lane, 2009a ; Betin and Lane, 2009b). D'autres données suggèrent un lien entre GABARAPL1 et apoptose. En effet, la protéine GABARAPL1 interagit également avec la protéine pro-apoptotique Nix (Novak *et al.*, 2010) et le message est régulé au niveau transcriptionnel par E2F1 (Kusama *et al.*, 2009). De plus, la protéine GABARAPL1, comme GABARAP, pourrait interagir avec la protéine DDX47 [DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 47], une hélicase à ARN, qui co-exprimée avec GABARAP induit l'apoptose de cellules tumorales ovariennes SKOV-3 (Lee *et al.*, 2005).

Par ailleurs, le clivage de GABARAPL1 en aval de Gly¹¹⁶ a été étudié par rapport à son rôle dans le transport du récepteur κ aux opioïdes. Chen et collaborateurs ont récemment pu démontrer que le clivage de GABARAPL1 n'est pas requis pour sa participation au transport du KOR du réticulum endoplasmique au Golgi (Chen *et al.*, 2011). Par conséquent, le transport de KOR est indépendant du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie. Au contraire, et de manière surprenante, le clivage de GABARAP est quant à lui requis pour ce même transport. Ce clivage de GABARAP est nécessaire pour le transport du récepteur GABA_A (Chen *et al.*, 2007) mais ne l'est pas pour celui du récepteur AT₁ de l'angiotensine II (Alam *et al.*, 2010). Les auteurs expliqueraient cette différence majeure par le fait que GABARAPL1 possède une affinité de liaison plus forte pour le KOR que GABARAP. Il serait intéressant de déterminer si le clivage de GABARAPL1 est essentiel ou non pour l'éventuel trafic intracellulaire des récepteurs GABA_A et des AT₁.

- ***Gabarapl1*, cancer et autophagie**

Il est désormais clairement admis que la tumorigenèse et la progression tumorale sont étroitement liées à l'autophagie. En revanche, l'autophagie exerce des rôles contradictoires vis-à-vis des cancers (de Bruin and Medema, 2008 ; Eskelinen, 2011 ; Morselli *et al.*, 2009). Dans les étapes précoces de la tumorigenèse, l'autophagie a un rôle anti-tumoral car elle empêche la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses en dégradant les

protéines et organites endommagés, sources de stress pour les cellules. Elle permet ainsi de réduire l'instabilité chromosomique, la prolifération et l'inflammation des cellules tumorales. Au cours d'étapes plus tardives de la progression tumorale et particulièrement avant l'angiogenèse, l'autophagie représente aussi un mécanisme pro-tumoral en permettant la survie des cellules cancéreuses exposées à un stress métabolique tel que l'hypoxie ou la carence nutritionnelle. Un lien direct entre l'autophagie et le cancer a pu être mis en évidence grâce à la l'identification de plusieurs acteurs de l'autophagie et en particulier de la protéine Beclin 1 (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009 ; Karantza-Wadsworth and White, 2007). D'une part, Beclin 1 en interaction avec d'autres protéines régulatrices de l'autophagie active la formation des autophagosomes en amont de l'intervention de GABARAPL1 (Patingre *et al.*, 2008) et d'autre part, le gène *beclin 1* est un gène suppresseur de tumeur agissant par un mécanisme d'haplo-insuffisance, c'est-à-dire qu'une seule copie de ce gène n'est pas suffisante pour assurer sa fonction protectrice au niveau de la cellule. Des délétions mono-alléliques du gène *beclin 1* sont fréquemment observées dans les cancers spontanés du sein, de l'ovaire et de la prostate (Aita *et al.*, 1999). Le taux de Beclin 1 est faible dans les tissus cancéreux de sein et dans la lignée MCF-7. Sa surexpression dans la lignée MCF-7 conduit à une réduction de leur prolifération et de leur pouvoir tumorigène *in vitro* en diminuant leur croissance en agar mou et *in vivo* après transplantation chez la souris immuno-déficiente (Liang *et al.*, 1999). Beclin 1 possède également un domaine BH3 et peut de ce fait interagir avec des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 résultant en l'inhibition de l'activation de l'autophagie médiée par Beclin 1. Beclin 1 ne peut alors plus intégrer le complexe protéique intervenant au niveau de la phase de nucléation des autophagosomes au sein duquel Beclin 1 joue un rôle d'activateur de l'autophagie (Maiuri *et al.*, 2007). De plus, Oh et collaborateurs ont pu démontrer qu'une inhibition de l'autophagie par liaison de BCL-2 à Beclin 1 entraîne une augmentation de la tumorigénicité des cellules MCF-7 surexprimant Beclin 1, indépendamment de son activité anti-apoptotique (Oh *et al.*, 2011).

D'autres protéines autophagiques comme la protéine Atg5 ou Atg4C permettent également d'établir une relation avec les cancers (Liang and Jung, 2010). Atg5 peut en effet, sous une forme tronquée, se localiser au niveau des mitochondries et se lier à BCL-XL provoquant ainsi la dissociation du complexe BCL-XL/BAX (BCL-2-Associated X protein). Il en résulte la libération du cytochrome c suivie de l'activation des caspases permettant l'induction de l'apoptose (Yousefi *et al.*, 2006). De plus, des souris déficientes en protéine Atg4C développent plus facilement des fibrosarcomes suite à l'utilisation de carcinogènes

chimiques (Marino *et al.*, 2007). Dans l'avenir, il serait donc intéressant d'éclaircir le lien entre GABARAPL1 et apoptose en déterminant si GABARAPL1 peut se lier à d'autres protéines anti-ou pro-apoptotiques et en particulier avec BCL-2. GABARAPL1 interagit en effet déjà avec la protéine pro-apoptotique Nix (Novak *et al.*, 2010).

Beclin 1 peut également réguler la réponse aux estrogènes dans le cancer du sein en diminuant la transcription des gènes cibles des estrogènes et en limitant leur effet prolifératif dans des cellules MCF-7 surexprimant Beclin 1. Les auteurs proposent que cet effet pourrait s'expliquer par le fait que Beclin 1 interagit avec le RE α et inhibe ainsi son rôle de facteur de transcription. En présence d'anti-estrogènes (raloxifène ou 4-hydroxytamoxifène), l'effet anti-prolifératif recherché n'est pas observé suggérant que Beclin 1 contribue à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements (John *et al.*, 2008).

Des interrelations sont d'ores et déjà existantes entre autophagie, cancer, apoptose et régulation estrogénique. La protéine GABARAPL1 présente de nombreux points communs avec la protéine Beclin 1 et pourrait ainsi constituer un nouveau lien entre ces différents phénomènes. Par ailleurs, le processus autophagique est induit en réponse à divers traitements anti-cancéreux. Cette réponse peut s'avérer être un mécanisme permettant la survie des cellules, ou favorisant et amplifiant la mort induite par ces traitements (Chen and Karantza, 2011 ; Chen *et al.*, 2010 ; Roy and Debnath, 2010). Toutes ces données permettent de supposer que GABARAPL1 pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer du sein. L'exploration de cette voie a été initiée au laboratoire par détermination de l'effet de composés utilisés en thérapie anti-cancéreuse, un composé anti-estrogénique, le 4-hydroxytamoxifène, et la rapamycine, un inducteur de l'autophagie, sur la prolifération des cellules MCF-7 parentales, MCF-7 contrôle et MCF-7 surexprimant FLAG-GABARAPL1-6HIS. Ces résultats préliminaires ont montré que ces composés ralentissent la croissance des cellules MCF-7 mais la surexpression de GABARAPL1 n'a pas d'effet vis-à-vis de la prolifération des cellules traitées. Il est important de préciser qu'aucune expérience n'a pu, jusqu'à présent, mettre en évidence l'estrogéno-dépendance de *gabarapl1* dans les cellules MCF-7. Les investigations seront poursuivies par l'utilisation d'autres composés anti-estrogéniques en combinaison ou non avec d'autres inducteurs ou inhibiteurs de l'autophagie.

Des données récentes ont mis en évidence l'implication de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie sélective de mitochondries et de protéines endommagées *via* son interaction avec des protéines adaptatrices Nix, p62 et NBR1 (Kirkin *et al.*, 2009b ; Novak *et*

al., 2010 ; Pankiv *et al.*, 2007). Cette implication de GABARAPL1 dans un tel processus renforce l'hypothèse voulant que GABARAPL1 joue également un rôle dans le phénomène de neurodégénérescence, engendré notamment par l'accumulation de protéines endommagées. L'interaction de GABARAPL1 avec la protéine α -synucléine est recherchée dans des lignées neuronales, comme la lignée humaine SH-SY5Y dérivée de neuroblastome, au laboratoire. L' α -synucléine est une protéine jouant un rôle clé dans la maladie de Parkinson car son agrégation est en partie responsable de cette maladie. Une étude réalisée à partir d'une puce à protéines a d'ores et déjà permis d'identifier une interaction entre GABARAPL1 et l' α -synucléine mais sa caractérisation n'a cependant pas été poursuivie (Schnack *et al.*, 2008). Une cartographie précise de l'expression de l'ARNm *gabarapl1* dans le cerveau de rat a permis de mettre en évidence sa distribution ubiquitaire soulignant l'importance de *gabarapl1* dans le système nerveux central (Tolle *et al.*, 2008). Toutefois *gabarapl1* présente une expression non homogène, avec une localisation exclusivement neuronale, et notamment une forte expression dans la *substantia nigra pars compacta* composée de neurones dopaminergiques atteints préférentiellement dans la maladie de Parkinson. L'étude de l'expression de la protéine GABARAPL1 a été récemment entreprise au laboratoire dans le but d'établir une possible corrélation avec le profil d'expression du messager, et particulièrement au niveau des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra pars compacta*. Le rôle de GABARAPL1 dans le cerveau ne se limite donc sûrement pas au transport de récepteurs intracellulaires.

- **GABARAPL1, HSP90 α/β et dégradation par le protéasome**

Afin de mieux comprendre le rôle de *gabarapl1* au niveau cellulaire, la recherche de nouveaux partenaires de la protéine GABARAPL1 a été réalisée à partir d'un lysat protéique de cerveau de rat par la technique de GST pull-down couplée à la spectrométrie de masse. Nous avons pu identifier différentes protéines dont la plupart est impliquée dans le transport ou l'endocytose de récepteurs tels que la tubuline, la protéine adaptatrice AP-2, la protéine D100 ou dynamine ou la chaîne lourde de la clathrine par ailleurs déjà connue pour se lier à la protéine GABARAP (Mohrluder *et al.*, 2007).

Parmi ces partenaires potentiels, la protéine de choc thermique HSP90 β nous est apparue comme particulièrement intéressante car exprimée de manière ubiquitaire et impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires et en particulier le repliement de très nombreuses protéines dites protéines « clientes ». La protéine HSP90 α/β présente deux isoformes

possédant 86% d'identité et se différenciant essentiellement par le fait que l'isoforme α est celle la plus inductible par différents stress (choc thermique, radiations ionisantes, agents cytotoxiques) alors que l'isoforme β est exprimée de manière constitutive et est moins inductible (Sreedhar *et al.*, 2004). La protéine HSP90 α/β , en association avec différents co-chaperons comme HSP70 (Heat Shock Protein 70) HSP40 ou HOP (HSP70/HSP90 Organizing Protein), stabilise et régule ainsi l'activité des protéines qu'elle chaperonne en empêchant leur dégradation cellulaire, en général assurée par la voie du protéasome. L'activité de HSP90 α/β est dépendante de la fixation d'ATP au niveau de sa partie N-terminale puis de son hydrolyse. Des inhibiteurs compétitifs spécifiques de la fixation d'ATP, comme le radicicol, la geldanamycine et ses dérivés : le 17-AAG et le 17-DMAG (17-desmethoxy-17-N,N-DiMethylAminoethylaminoGeldanamycin) peuvent bloquer l'activité de HSP90 α/β en provoquant des changements conformationnels de cette protéine résultant en la dissociation de l'interaction avec ses protéines « clientes » (Sharp and Workman, 2006). Les protéines « clientes » de HSP90 α/β sont de nature variée mais on peut distinguer principalement deux classes de protéines, des kinases telles que AKT, RAF (Ras-Activated Factor) ou v-SRC [sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene] et des facteurs de transcription, dont les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Csermely *et al.*, 1998 ; Picard, 2002). Ces protéines sont généralement impliquées dans la survie cellulaire ou la croissance cellulaire. Cependant, la protéine p53 qui joue un rôle suppresseur de tumeur, peut également être chaperonnée par HSP90 α/β (Muller *et al.*, 2004). La signification biologique de l'interaction a été étudiée suite à l'utilisation des inhibiteurs geldanamycine et radicicol. En présence de ces inhibiteurs, le taux de la protéine p53 diminue faiblement. Cependant, la transcription du gène p21, régulée par p53 et dont la protéine joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, est fortement diminuée (Walerych *et al.*, 2004).

Une forte expression de HSP90 α/β est observée dans beaucoup de cancers, en particulier dans les leucémies, les cancers de l'ovaire et du sein et représente un facteur de mauvais pronostic (Pick *et al.*, 2007). Par conséquent l'inhibition de l'activité de cette protéine constitue une nouvelle stratégie utilisée pour les traitements anti-cancéreux, en particulier *via* le 17-AAG qui est en essais cliniques de phase II et de phase III dans plusieurs types de cancers, en combinaison ou non avec d'autres composés anti-cancéreux (Banerji, 2009 ; Gimenez Ortiz and Montalar Salcedo, 2010 ; Modi *et al.*, 2011 ; Usmani *et al.*, 2009). Cependant, on peut se poser la question de l'intérêt de bloquer l'activité de HSP90 α/β dans le

cas de son association avec des protéines jouant le rôle de suppresseurs de tumeurs comme p53 et éventuellement GABARAPL1.

Nous avons démontré l'interaction *in vitro* directe de GABARAPL1 avec les deux isoformes α et β de HSP90 et *in vivo* à partir de lysats protéiques de cerveau de rat et de cellules MCF-7. De plus, GABARAPL1 et HSP90 α/β co-localisent partiellement au niveau de vésicules intracytoplasmiques dans deux régions du cerveau exprimant fortement le messenger *gabarapl1*: le cortex rétrosplénial et la *substantia nigra*, ainsi que dans les cellules MCF-7. Dans le cerveau, HSP90 α/β est exprimée dans toutes les régions et présente une distribution majoritairement neuronale et cela dans toutes les sous-populations de neurones (Gass *et al.*, 1994). Il serait intéressant d'explorer en parallèle l'expression des messagers et des protéines GABARAPL1 et HSP90 α/β de manière plus étendue dans le cerveau. Récemment, Fukuyama et collaborateurs ont pu démontré une expression de *hsp90 α* (*hsp86*) et de *hsp90 β* (*hsp84*) sous le contrôle des rythmes circadiens dans le noyau suprachiasmatique de souris élevées dans des conditions de lumière (12 h)-obscurité (12 h) ou d'obscurité totale. Cependant, ces variations d'expression ne seraient pas dues à une régulation directe de *hsp90 α/β* par les facteurs de transcription de l'horloge circadienne (Fukuyama *et al.*, 2008). Or *gabarapl1* est lui aussi régulé par les rythmes circadiens dans les cellules GnV-3 suite à un choc sérique (Mansuy *et al.*, 2009) et dans le foie de souris après 6 h d'exposition à la lumière (Sakao *et al.*, 2003). L'expression, en parallèle, de *gabarapl1* et de *hsp90 α/β* au niveau du messenger et au niveau protéique pourrait ainsi être étudiée dans le noyau suprachiasmatique de rats ou de souris en fonction de différents temps d'exposition à la lumière et à l'obscurité.

Par ailleurs, nos résultats n'excluent cependant pas la possibilité d'une interaction entre GABARAP et HSP90 α/β dans le cerveau de rat dans la mesure où GABARAP est également immunoprécipitée dans des expériences d'immunoprécipitation réalisées à l'aide de l'anticorps anti-GABARAPL1 du groupe Protein Tech. En effet, nous avons également pu démontrer une interaction directe de GABARAP avec la protéine purifiée HSP90 β dans des expériences de GST pull-down. De plus, une étude à grande échelle visant à identifier les partenaires des protéines impliquées dans l'autophagie a été effectuée par immunoprécipitation à partir de cellules HEK293 (Behrends *et al.*, 2010). Parmi les nombreuses protéines identifiées dans cette étude, HSP90 sous forme α ou β serait un partenaire de GABARAPL1 mais aussi de GABARAP, GATE-16, LC3A, LC3B et LC3C

dans ces cellules. La validation des interactions par d'autres techniques n'a cependant pas été réalisée.

Suite à l'inactivation de HSP90 α/β au moyen de l'inhibiteur spécifique 17-AAG, GABARAPL1 est dégradée dans les cellules MCF-7. La protéine chaperon HSP90 α/β protège ainsi GABARAPL1 de la dégradation dans ces cellules et participe donc à sa stabilité. A l'aide de plusieurs inhibiteurs spécifiques de l'activité du protéasome 26S, nous avons montré que la diminution du taux de la protéine GABARAPL1 est en réalité due à sa dégradation *via* la voie du protéasome. Ainsi, la protéine GABARAPL1 n'est donc pas seulement dégradée par la voie lysosomale en condition d'autophagie. L'expression de *flag-gabarapl1-6his* n'étant pas sous la dépendance du promoteur *gabarapl1*, nous pouvons affirmer que l'augmentation du taux de protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS observée est uniquement due à une augmentation de sa stabilité. Cependant, concernant la protéine GABARAPL1 endogène, une régulation transcriptionnelle positive de l'ARNm *gabarapl1* ou une augmentation de sa stabilité peut de plus s'additionner à cette augmentation de stabilité de la protéine car une augmentation importante du taux d'ARNm *gabarapl1* est observée dans les cellules MCF-7 après traitement au MG132. D'autres équipes ont également mis en évidence, par analyse en micro-array, une élévation du taux d'ARNm *gabarapl1* et *lc3* dans des cellules cancéreuses de prostate ou de pancréas suite au traitement par des inhibiteurs du protéasome (Tang *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2006b). En revanche, un traitement des cellules MCF-7 par le 17-AAG entraîne également une augmentation du taux de messenger *gabarapl1*, mais dans une moindre mesure par rapport au traitement par le MG132, ce qui renforce l'effet de régulation négative observé pour la protéine GABARAPL1. Dans ce cas et contrairement au traitement par le MG132, l'ARNm et la protéine seraient régulées de manière opposée.

Plusieurs perspectives se dégagent suite à l'obtention de ces résultats. Il serait donc intéressant d'évaluer précisément, d'une part, la stabilité du messenger *gabarapl1* en bloquant la transcription à l'aide d'actinomycine D et d'autre part, la stabilité de la protéine GABARAPL1 en bloquant la traduction à l'aide de cycloheximide, suite à un pré-traitement des cellules MCF-7 par un inhibiteur du protéasome. Un choc thermique sera également réalisé de manière à évaluer les taux des ARNm *hsp90 α* , *hsp90 β* et *gabarapl1* et des protéines correspondantes de manière à pouvoir éventuellement corrélérer leurs expressions. De plus, l'expression des ARNm *hsp90 α* et *hsp90 β* pourrait être évaluée dans les différentes lignées de cancer du sein disponibles au laboratoire pour lesquelles l'expression de l'ARNm *gabarapl1* a déjà été déterminée. La prolifération de la lignée MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS pourrait

être évaluée suite à un traitement des cellules par du 17-AAG, ce composé étant connu pour provoquer une diminution de la prolifération des cellules MCF-7 et d'autres lignées cancéreuses de sein humain (Zajac *et al.*, 2008).

En revanche, dans nos expériences, le taux de protéines GABARAP ne varie pas en fonction des différents traitements inhibiteurs suggérant une régulation post-traductionnelle différente de GABARAP et GABARAPL1 dans ces cellules cancéreuses. D'autres travaux ont montré que GABARAP n'est ni ubiquitinylée ni dégradée par le protéasome dans des neurones (Chen *et al.*, 2007). *In vitro*, la protéine LC3B peut être dégradée par le protéasome sans pour autant être préalablement ubiquitinylée (Gao *et al.*, 2010). L'éventuelle ubiquitinylation de GABARAPL1 sera alors recherchée par des expériences de co-immunoprécipitation. Deux résidus lysine en position 35 et 117, ce dernier étant non présent dans les séquences des autres protéines de la famille Atg8, pourraient potentiellement représenter des résidus cibles de l'ubiquitine (logiciel UbPred).

L'ensemble de nos résultats ainsi que les différentes informations apportées par la littérature nous ont permis de proposer un modèle de protection de GABARAPL1 par HSP90 α/β vis-à-vis de la dégradation par le protéasome (Figure 30).

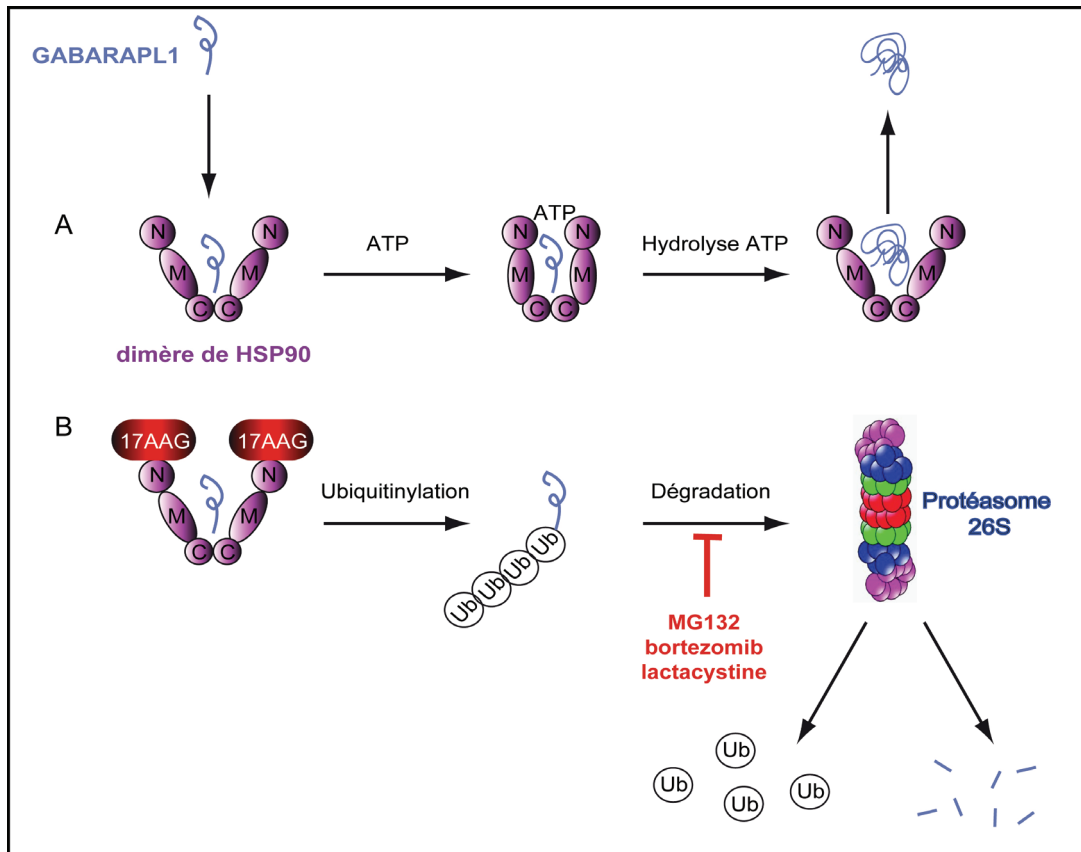


Figure 30 : Représentation schématique de l'activité chaperon de HSP90α/β dans le cas de GABARAPL1 comme protéine « cliente ». **A.** La protéine HSP90α/β, sous forme de dimère, s'associe à GABARAPL1. La liaison puis l'hydrolyse de l'ATP induisent des changements conformationnels de HSP90α/β permettant le repliement correct puis la libération de GABARAPL1. **B.** Le 17-AAG est en compétition avec l'ATP pour la fixation au niveau du domaine N-terminal de HSP90α/β. La fixation du 17-AAG dissocie la liaison GABARAPL1-HSP90α/β ce qui pourrait conduire à l'ubiquitinylation de GABARAPL1. Il s'ensuit une dégradation de GABARAPL1 par le protéasome qui peut être bloquée par utilisation d'inhibiteurs spécifiques réversibles (MG132 et bortezomib) ou irréversible (lactacystine). 17-AAG : 17-AllylAmino-17-demethoxyGeldanamycin ; C : domaine C-terminal ; N : domaine N-terminal ; M : domaine central ; Ub : ubiquitine.

Jusqu'à présent, à l'exception du clivage en aval du résidu glycine en position C-terminale, les modifications post-traductionnelles potentielles de la protéine GABARAPL1 et des autres protéines de la famille Atg8 ont fait l'objet de peu d'études. Seules des données préliminaires obtenues en collaboration avec le laboratoire du Pr. Uwe Schlattner à Grenoble ont montré que la protéine GABARAPL1 est phosphorylée *in vitro* par la kinase AMPK. L'AMPK est également responsable de la phosphorylation suivie de l'activation des protéines FoxO (Greer *et al.*, 2007a ; Greer *et al.*, 2007b) et on peut ainsi supposer que *gabarapl1* pourrait être également induit. Des expériences activant l'AMPK *via* le composé AICAR (AminoImidazole CARboxamide Ribonucleotide) sont actuellement en cours au laboratoire dans diverses lignées cellulaires, y compris dans la lignée MCF-7, afin d'évaluer le taux de

protéine GABARAPL1. Par ailleurs, une inhibition spécifique de p38 α par l'inhibiteur SB202190 entraîne une activation de FoxO3A dépendante de l'AMPK responsable de l'induction de la transcription de gènes impliqués dans le processus d'autophagie tels que *gabarapl1*, *gabarap*, *lc3* et *atg12* dans les cellules HT29 (Chiacchiera *et al.*, 2009 ; Chiacchiera and Simone, 2009). Cet inhibiteur sera utilisé pour traiter la lignée MCF-7 et le taux de la protéine GABARAPL1 sera ensuite évalué. De plus, une relation directe entre l'AMPK et le processus d'autophagie a été récemment établie par la découverte de la phosphorylation de la protéine ULK1 par cette enzyme, entraînant une activation de la formation des autophagosomes (Mao and Klionsky, 2011).

La protéine LC3 peut être phosphorylée, d'une part par la protéine kinase C ce qui n'entraîne pas de modification du taux intracellulaire d'autophagie (Jiang *et al.*, 2010a) et, d'autre part, par la protéine kinase A au niveau du résidu sérine en position 12 chez le rat, résultant en la diminution du recrutement et de la participation de LC3 au processus d'autophagie (Cherra *et al.*, 2010). Concernant GABARAP et GATE-16, aucune donnée concernant une éventuelle phosphorylation n'a été rapportée à ce jour.

L'inhibition de la voie de dégradation par le protéasome aboutit généralement à l'induction du processus d'autophagie comme en témoigne l'augmentation de la forme correspondant à la forme lipidée LC3-II (Ding *et al.*, 2007 ; Milani *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2008). Dans des cellules cancéreuses de colon HT29, l'activation de l'autophagie suite à l'inhibition de l'activité du protéasome par le MG132 se traduit par une diminution de la prolifération cellulaire (Wu *et al.*, 2008). De plus, le traitement des cellules MCF-7 par du bortezomib induit à la fois un stress du réticulum et l'induction de l'autophagie *via* augmentation de la forme LC3-II (Milani *et al.*, 2009). Une induction de la forme LC3-II a été effectivement observée dans nos conditions de traitement par le MG132 mais nous n'avons pas vu apparaître la forme GABARAPL1-II ce qui souligne que ces protéines n'agissent pas forcément ensemble pour permettre la formation des autophagosomes.

Cette étude a principalement permis de détecter, pour la première fois, la protéine GABARAPL1 endogène, dégradée dans des conditions normales, dans les cellules MCF-7 FLAG-GABARAPL1-6HIS suite à l'inhibition de l'activité du protéasome. L'hétérogénéité histologique et clinique du cancer du sein, en partie responsable des échecs thérapeutiques, reflète sa nature moléculaire complexe. La caractérisation moléculaire s'est approfondie ces dernières années et a mis au jour de nouvelles cibles thérapeutiques à la base du développement de nouveaux composés anti-cancéreux. Les inhibiteurs du protéasome, et

spécialement le bortezomib, sont depuis peu utilisés dans le traitement de plusieurs types de cancers tels que le myélome multiple (Morgan *et al.*, 2008). Son efficacité dans le traitement des cancers du sein est actuellement controversée car de nombreux facteurs sont déterminants pour la réussite du traitement, tels que la signature moléculaire des cellules tumorales, le stade d'avancement ou l'association ou non avec d'autres traitements anti-cancéreux (Codony-Servat *et al.*, 2006 ; Irvin *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2006a). Une combinaison du bortezomib avec des composés anti-estrogéniques constituerait actuellement une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2010). De plus, l'association du bortezomib avec du 17-AAG potentialise l'effet antiprolifératif de chacun de ces composés dans les cellules MCF-7 (Mimnaugh *et al.*, 2004) et donne des résultats positifs dans le traitement de différents types de cancers, particulièrement dans les myélomes (Richardson *et al.*, 2011).

Ainsi, la croissance des cellules MCF-7 suite à la restauration de GABARAPL1 par inhibition de l'activité du protéasome pourrait être évaluée. L'effet de l'association d'inhibiteurs du protéasome avec des inducteurs ou des inhibiteurs de l'autophagie, des antagonistes des estrogènes ou des inhibiteurs de l'activité de HSP90 α/β sera recherché dans ces cellules en déterminant l'expression de GABARAPL1 et en évaluant la prolifération cellulaire.

L'acquisition de nouveaux modèles cellulaires, de souris *gabarapl1*^{-/-} et/ou *gabarap*^{-/-} ou de souris transgéniques surexprimant *gabarapl1* est indispensable afin de préciser le rôle de GABARAPL1 dans les différentes voies énoncées dans cette discussion. Un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris issus de souris *gabarap*^{-/-} est actuellement en cours d'élaboration au laboratoire ce qui nous permettra d'étudier exclusivement *gabarapl1* en s'affranchissant d'une possible redondance de *gabarap* dans les différents processus cellulaires étudiés au laboratoire et en particulier dans la tumorigenèse.

La caractérisation de *gabarapl1* s'est considérablement intensifiée ces dernières années avec l'exploration de son rôle dans les cancers, en particulier le cancer du sein, et de son rôle dans le processus d'autophagie mais les mécanismes moléculaires mis en jeu restent indéterminés à ce jour et seront particulièrement recherchés par notre équipe. L'identification de la protéine HSP90 α/β comme partenaire de GABARAPL1 a permis d'obtenir des informations concernant la régulation post-traductionnelle de GABARAPL1 dans des cellules

cancéreuses de sein humain. De nouveaux partenaires de GABARAPL1, et spécialement dans des conditions d'autophagie, seront recherchés dans ces cellules afin de préciser l'implication de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie sélective ou non ainsi que dans le processus de tumorigenèse et/ou progression tumorale.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Accili, D. and Arden, K. C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**: 421-6.

Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T. C. and 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, K. M., Re, R. N. and Cook, J. L. (2010). C-terminal processing of GABARAP is not required for trafficking of the angiotensin II type 1A receptor. *Regul Pept* **159**: 78-86.

Amar, N., Lustig, G., Ichimura, Y., Ohsumi, Y. and Elazar, Z. (2006). Two newly identified sites in the ubiquitin-like protein Atg8 are essential for autophagy. *EMBO Rep* **7**: 635-42.

Arnes, J. B., Brunet, J. S., Stefansson, I., Begin, L. R., Wong, N., Chappuis, P. O., Akslen, L. A. and Foulkes, W. D. (2005). Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 4003-11.

Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y. and Fukamizu, A. (2007). Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* **19**: 519-27.

Banerji, U. (2009). Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res* **15**: 9-14.

Barthel, A., Schmoll, D. and Unterman, T. G. (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **16**: 183-9.

Bavro, V. N., Sola, M., Bracher, A., Kneussel, M., Betz, H. and Weissenhorn, W. (2002). Crystal structure of the GABA(A)-receptor-associated protein, GABARAP. *EMBO Rep* **3**: 183-9.

Beau, I., Mehrpour, M. and Codogno, P. (2011). Autophagosomes and human diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 460-4.

Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. and Harper, J. W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**: 68-76.

Belcher, S. M. (2008). Rapid signaling mechanisms of estrogens in the developing cerebellum. *Brain Res Rev* **57**: 481-92.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A. V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A. M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le Stang, N., Maynadie, M., Monnereau, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schwartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L. and Velten, M. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**: 159-75.

Berthier, A. (2008). Développement d'outils « biocapteurs/modèle cellulaire » pour l'identification de ligands et l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines. Université de Franche-Comté-Besançon.

Bertucci, F., Borie, N., Ginestier, C., Groulet, A., Charafe-Jauffret, E., Adelaide, J., Geneix, J., Bachelart, L., Finetti, P., Koki, A., Hermitte, F., Hassoun, J., Debono, S., Viens, P., Fert, V., Jacquemier, J. and Birnbaum, D. (2004). Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* **23**: 2564-75.

Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Charafe-Jauffret, E., Mamessier, E., Adelaide, J., Debono, S., Houvenaeghel, G., Maraninchi, D., Viens, P., Charpin, C., Jacquemier, J. and Birnbaum, D. (2006). Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res* **66**: 4636-44.

Betin, V. M. and Lane, J. D. (2009a). Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **5**: 1057-9.

Betin, V. M. and Lane, J. D. (2009b). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* **122**: 2554-66.

Biggs, W. H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K. and Arden, K. C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7421-6.

Bocker, W. (2002). [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **86**: 116-9.

Bonkhoff, H. and Berges, R. (2009). The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol* **55**: 533-42.

Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **21**: 16-9.

Borresen-Dale, A. L. (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* **21**: 292-300.

Botha, J. L., Bray, F., Sankila, R. and Parkin, D. M. (2003). Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* **39**: 1718-29.

Boyle, P. and Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* **16**: 481-8.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-68.

Burd, C. G., Peterson, M., Cowles, C. R. and Emr, S. D. (1997). A novel Sec18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast. *Mol Biol Cell* **8**: 1089-104.

Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C. and Kaelin, C. M. (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* **350**: 1430-41.

Campbell, I. G., Nicolai, H. M., Foulkes, W. D., Senger, G., Stamp, G. W., Allan, G., Boyer, C., Jones, K., Bast, R. C., Jr. and Solomon, E. (1994). A novel gene encoding a B-box protein within the BRCA1 region at 17q21.1. *Hum Mol Genet* **3**: 589-94.

Carruba, G. (2006). Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* **1089**: 201-17.

Cato, A. C., Nestl, A. and Mink, S. (2002). Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* **2002**: re9.

Chakrama, F. Z. (2011). La protéine GABARAPL1/GEC1 : rôle au cours de l'autophagie et expression dans les cellules cancéreuses. Université de Franche-Comté-Besançon (soutenance de thèse prévue le 12 juillet 2011).

Chakrama, F. Z., Seguin-Py, S., Le Grand, J. N., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Despouy, G., Perez, V., Jouvenot, M. and Boyer-Guittaut, M. (2010). GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* **6**: 1-11.

Chebib, M. and Johnston, G. A. (1999). The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**: 937-40.

Chen, C., Li, J. G., Chen, Y., Huang, P., Wang, Y. and Liu-Chen, L. Y. (2006). GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* **281**: 7983-93.

Chen, C., Wang, Y., Huang, P. and Liu-Chen, L. Y. (2011). Effects of C-terminal Modifications of GEC1 Protein and γ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptor-associated Protein (GABARAP), Two Microtubule-associated Proteins, on κ Opioid Receptor Expression. *J Biol Chem* **286**: 15106-15.

Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J. H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D. and Greenberg, A. (1999). Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* **274**: 7-10.

Chen, L., Wang, H., Vicini, S. and Olsen, R. W. (2000). The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11557-62.

Chen, N. and Karantza-Wadsworth, V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1516-23.

Chen, N. and Karantza, V. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther* **11**: 157-68.

Chen, S., Rehman, S. K., Zhang, W., Wen, A., Yao, L. and Zhang, J. (2010). Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1806**: 220-9.

Chen, Y., Chen, C., Kotsikorou, E., Lynch, D. L., Reggio, P. H. and Liu-Chen, L. Y. (2009). GEC1-kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect. *J Biol Chem* **284**: 1673-85.

- Chen, Z. W., Chang, C. S., Leil, T. A., Olcese, R. and Olsen, R. W. (2005). GABAA receptor-associated protein regulates GABAA receptor cell-surface number in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **68**: 152-9.
- Chen, Z. W., Chang, C. S., Leil, T. A. and Olsen, R. W. (2007). C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* **27**: 6655-63.
- Chen, Z. W. and Olsen, R. W. (2007). GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem* **100**: 279-94.
- Cherra, S. J., 3rd, Kulich, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B. W. and Chu, C. T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol* **190**: 533-9.
- Chiacchiera, F., Matrone, A., Ferrari, E., Ingravallo, G., Lo Sasso, G., Murzilli, S., Petruzzelli, M., Salvatore, L., Moschetta, A. and Simone, C. (2009). p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription. *Cell Death Differ* **16**: 1203-14.
- Chiacchiera, F. and Simone, C. (2009). Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. *Autophagy* **5**: 1030-3.
- Clamp, A., Danson, S. and Clemons, M. (2003). Hormonal and genetic risk factors for breast cancer. *Surgeon* **1**: 23-31.
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E. and Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**: 412-20.
- Codony-Servat, J., Tapia, M. A., Bosch, M., Oliva, C., Domingo-Domenech, J., Mellado, B., Rolfe, M., Ross, J. S., Gascon, P., Rovira, A. and Albanell, J. (2006). Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**: 665-75.
- Cook, J. L., Re, R. N., deHaro, D. L., Abadie, J. M., Peters, M. and 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**: 1539-47.
- Coyle, J. E., Qamar, S., Rajashankar, K. R. and Nikolov, D. B. (2002). Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33**: 63-74.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* **79**: 129-68.
- Custer, B. S., Koepsell, T. D. and Mueller, B. A. (2002). The association between breast carcinoma and meningioma in women. *Cancer* **94**: 1626-35.
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. and Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* **366**: 1784-93.

- Daumas, S., Betourne, A., Halley, H., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Lassalle, J. M. and Frances, B. (2007). Transient activation of the CA3 Kappa opioid system in the dorsal hippocampus modulates complex memory processing in mice. *Neurobiol Learn Mem* **88**: 94-103.
- de Bruin, E. C. and Medema, J. P. (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* **34**: 737-49.
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci Am* **208**: 64-72.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**: 415-72.
- Dean, D. M. and Sanders, M. M. (1996). Ten years after: reclassification of steroid-responsive genes. *Mol Endocrinol* **10**: 1489-95.
- Denuc, A. and Marfany, G. (2010). SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem Soc Trans* **38**: 34-9.
- Deroo, B. J. and Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* **116**: 561-70.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T. and Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* **30**: 293-342.
- Dieci, G., Bottarelli, L., Ballabeni, A. and Ottonello, S. (2000). tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Protein Expr Purif* **18**: 346-54.
- Ding, W. X., Ni, H. M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D. B., Ron, D. and Yin, X. M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **171**: 513-24.
- Dupont, W. D. and Page, D. L. (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* **312**: 146-51.
- Dykstra, L. A., Gmerek, D. E., Winger, G. and Woods, J. H. (1987). Kappa opioids in rhesus monkeys. I. Diuresis, sedation, analgesia and discriminative stimulus effects. *J Pharmacol Exp Ther* **242**: 413-20.
- Elazar, Z., Scherz-Shouval, R. and Shorer, H. (2003). Involvement of LMA1 and GATE-16 family members in intracellular membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1641**: 145-56.
- Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J. H., Gorin, M., Wasielewski, M., van den Ouweland, A., Merajver, S. D., Ethier, S. P. and Schutte, M. (2006). BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* **66**: 41-5.
- Eskelinen, E. L. (2011). The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol*:

- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M. and Luscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**: 563-71.
- Falkenberry, S. S. and Legare, R. D. (2002). Risk factors for breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* **29**: 159-72.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* **18**: 581-92.
- Flint, A. P., Sheldrick, E. L. and Fisher, P. A. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domest Anim Endocrinol* **23**: 13-24.
- Fukunaga, K., Ishigami, T. and Kawano, T. (2005). Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: expression and function of forkhead transcription factors in neurons. *J Pharmacol Sci* **98**: 205-11.
- Fukuyama, T., Doi, M., Matsuo, M., Nishinaga, H., Miyake, S. and Okamura, H. (2008). Circadian expression of 86- and 84-kDa heat shock proteins in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biomed Res* **29**: 93-8.
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. and Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* **349**: 629-34.
- Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S. A., Ripperger, J. and Schibler, U. (2004). The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* **113**: 103-12.
- Gao, Z., Gammoh, N., Wong, P. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Jiang, X. (2010). Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome. *Autophagy* **6**: 126-37.
- Gass, P., Schroder, H., Prior, P. and Kiessling, M. (1994). Constitutive expression of heat shock protein 90 (HSP90) in neurons of the rat brain. *Neurosci Lett* **182**: 188-92.
- Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P. and Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* **63**: 1267-76.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S. and Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**: 1564-9.
- Geng, J. and Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**: 859-64.
- Gilley, J., Coffey, P. J. and Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* **162**: 613-22.
- Gimenez Ortiz, A. and Montalar Salcedo, J. (2010). Heat shock proteins as targets in oncology. *Clin Transl Oncol* **12**: 166-73.

- Goto, H., Terunuma, M., Kanematsu, T., Misumi, Y., Moss, S. J. and Hirata, M. (2005). Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA(A) receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* **30**: 197-206.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Green, F., O'Hare, T., Blackwell, A. and Enns, C. A. (2002). Association of human transferrin receptor with GABARAP. *FEBS Lett* **518**: 101-6.
- Greer, E. L. and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**: 7410-25.
- Greer, E. L., Dowlatshahi, D., Banko, M. R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S. P. and Brunet, A. (2007a). An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol* **17**: 1646-56.
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P. and Brunet, A. (2007b). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* **282**: 30107-19.
- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. and Heuser, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**: 523-35.
- Hayashi, T., Okabe, T., Nasu-Nishimura, Y., Sakaue, F., Ohwada, S., Matsuura, K., Akiyama, T. and Nakamura, T. (2007). PX-RICS, a novel splicing variant of RICS, is a main isoform expressed during neural development. *Genes Cells* **12**: 929-39.
- He, C., Bartholomew, C. R., Zhou, W. and Klionsky, D. J. (2009). Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos. *Autophagy* **5**: 520-6.
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., Zhao, S., Liu, J. O. and 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**: 29278-87.
- Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M. and Ploegh, H. L. (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**: 51841-50.
- Henderson, B. E. and Feigelson, H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**: 427-33.
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C. and Casagrande, J. T. (1982). Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* **42**: 3232-9.
- Hirata, M., Kanematsu, T., Takeuchi, H. and Yagisawa, H. (1998). Pleckstrin homology domain as an inositol compound binding module. *Jpn J Pharmacol* **76**: 255-63.

- Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J. Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R. and Hung, M. C. (2004). IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* **117**: 225-37.
- Huang, H. and Tindall, D. J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* **120**: 2479-87.
- Hyder, S. M., Chiappetta, C. and Stancel, G. M. (1999). Interaction of human estrogen receptors alpha and beta with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochem Pharmacol* **57**: 597-601.
- Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T., Okuyama, A. and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene* **18**: 4523-9.
- Irvin, W. J., Jr., Orlowski, R. Z., Chiu, W. K., Carey, L. A., Collichio, F. A., Bernard, P. S., Stijleman, I. J., Perou, C., Ivanova, A. and Dees, E. C. (2010). Phase II study of bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* **10**: 465-70.
- Jaeger, P. A. and Wyss-Coray, T. (2009). All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* **4**: 16.
- Jagadeesh, G. (1998). Angiotensin II receptors-antagonists, molecular biology, and signal transduction. *Indian J Exp Biol* **36**: 1171-94.
- Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 631-43.
- Janecka, A., Fichna, J. and Janecki, T. (2004). Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem* **4**: 1-17.
- Jiang, H., Cheng, D., Liu, W., Peng, J. and Feng, J. (2010a). Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochem Biophys Res Commun* **395**: 471-6.
- Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V. S., Zhai, L., Irimia, J. M., DePaoli-Roach, A. A., Wells, C. D., Skurat, A. V. and Roach, P. J. (2010b). Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem* **285**: 34960-71.
- Johansen, T. and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**:
- John, S., Nayvelt, I., Hsu, H. C., Yang, P., Liu, W., Das, G. M., Thomas, T. and Thomas, T. J. (2008). Regulation of estrogenic effects by beclin 1 in breast cancer cells. *Cancer Res* **68**: 7855-63.
- Jones, C., Hammer, R. E., Li, W. P., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. and Herz, J. (2003). Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Biol Chem* **278**: 29024-30.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* **19**: 5720-8.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**: 2805-12.

Kaestner, K. H., Knochel, W. and Martinez, D. E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**: 142-6.

Kanematsu, T., Jang, I. S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N. and Hirata, M. (2002). Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *EMBO J* **21**: 1004-11.

Kanematsu, T., Misumi, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S., Koga, T., Iwanaga, S., Ikehara, Y. and Hirata, M. (1996). A new inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein similar to phospholipase C-delta 1. *Biochem J* **313 (Pt 1)**: 319-25.

Kanematsu, T., Mizokami, A., Watanabe, K. and Hirata, M. (2007). Regulation of GABA(A)-receptor surface expression with special reference to the involvement of GABARAP (GABA(A) receptor-associated protein) and PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein). *J Pharmacol Sci* **104**: 285-92.

Kanematsu, T., Takeuchi, H., Terunuma, M. and Hirata, M. (2005). PRIP, a novel Ins(1,4,5)P3 binding protein, functional significance in Ca²⁺ signaling and extension to neuroscience and beyond. *Mol Cells* **20**: 305-14.

Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2007). Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy* **3**: 610-3.

Kassiotis, C., Ballal, K., Wellnitz, K., Vela, D., Gong, M., Salazar, R., Frazier, O. H. and Taegtmeyer, H. (2009). Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* **120**: S191-7.

Kaushik, N., Fear, D., Richards, S. C., McDermott, C. R., Nuwaysir, E. F., Kellam, P., Harrison, T. J., Wilkinson, R. J., Tyrrell, D. A., Holgate, S. T. and Kerr, J. R. (2005). Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* **58**: 826-32.

Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**: 761, 763.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**: 263-76.

Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T. and Dikic, I. (2009a). NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* **5**: 732-3.

Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjorkoy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J. P., Overvatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I. and Johansen, T. (2009b). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**: 505-16.

Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. and Dikic, I. (2009c). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* **34**: 259-69.

Kittler, J. T., Rostaing, P., Schiavo, G., Fritschy, J. M., Olsen, R., Triller, A. and Moss, S. J. (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. and 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, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C. and Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**: 215-25.

Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U. and Ryffel, G. U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* **46**: 1053-61.

Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* **29**: 2905-19.

Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 931-7.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-45.

Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. and Seglen, P. O. (2007). Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* **3**: 181-206.

Kneussel, M., Haverkamp, S., Fuhrmann, J. C., Wang, H., Wassle, H., Olsen, R. W. and 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**: 8594-9.

Knight, D., Harris, R., McAlister, M. S., Phelan, J. P., Geddes, S., Moss, S. J., Driscoll, P. C. and Keep, N. H. (2002). 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* **277**: 5556-61.

Ko, G. Y., Shi, L. and Ko, M. L. (2009). Circadian regulation of ion channels and their functions. *J Neurochem* **110**: 1150-69.

Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L. and Burgering, B. M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**: 630-4.

Korde, L. A., Calzone, K. A. and Zujewski, J. (2004). Assessing breast cancer risk: genetic factors are not the whole story. *Postgrad Med* **116**: 6-8, 11-4, 19-20.

Korkola, J. E., DeVries, S., Fridlyand, J., Hwang, E. S., Estep, A. L., Chen, Y. Y., Chew, K. L., Dairkee, S. H., Jensen, R. M. and Waldman, F. M. (2003). Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res* **63**: 7167-75.

Kouno, T., Mizuguchi, M., Tanida, I., Ueno, T., Kanematsu, T., Mori, Y., Shinoda, H., Hirata, M., Kominami, E. and Kawano, K. (2005). Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *J Biol Chem* **280**: 24610-7.

Kroemer, G., Marino, G. and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**: 280-93.

Kusama, Y., Sato, K., Kimura, N., Mitamura, J., Ohdaira, H. and Yoshida, K. (2009). Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis* **14**: 1165-75.

Kuusisto, E., Salminen, A. and Alafuzoff, I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* **12**: 2085-90.

Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H. and Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J* **17**: 3597-607.

Le Grand, N., Chakrama, F. Z., Seguin-Py, S., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. and Boyer-Guittaut, M. (2011). GABARAPL1 (GEC1) : original or copycat? *Autophagy*: sous presse.

Leabu, M. (2006). Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med* **10**: 423-7.

Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S. R., Mitch, W. E. and Goldberg, A. L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* **18**: 39-51.

Lee, J. H., Rho, S. B. and 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**: 623-8.

Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Glozman, R. and Elazar, Z. (2000). Aut7p, a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane trafficking processes. *J Biol Chem* **275**: 32966-73.

- Leil, T. A., Chen, Z. W., Chang, C. S. and Olsen, R. W. (2004). GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* **24**: 11429-38.
- Levin, E. R. (2009). Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *J Physiol* **587**: 5019-23.
- Li, W., Yang, Q. and Mao, Z. (2011). Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* **68**: 749-63.
- Liang, C. and Jung, J. U. (2010). Autophagy genes as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 226-33.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-6.
- Liu, H. Y., Han, J., Cao, S. Y., Hong, T., Zhuo, D., Shi, J., Liu, Z. and 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. *J Biol Chem* **284**: 31484-92.
- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T. and Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* **19**: 264-71.
- Loven, M. A., Wood, J. R. and Nardulli, A. M. (2001). Interaction of estrogen receptors alpha and beta with estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol* **181**: 151-63.
- Lowrey, P. L. and Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**: 407-41.
- Ma, C., Niu, X., Luo, J., Shao, Z. and Shen, K. (2010). Combined effects of lapatinib and bortezomib in human epidermal receptor 2 (HER2)-overexpressing breast cancer cells and activity of bortezomib against lapatinib-resistant breast cancer cells. *Cancer Sci* **101**: 2220-6.
- Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., Geneste, O. and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* **3**: 374-6.
- Malyala, A., Kelly, M. J. and Ronnekleiv, O. K. (2005). Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids* **70**: 397-406.
- Malyala, A., Pattee, P., Nagalla, S. R., Kelly, M. J. and Ronnekleiv, O. K. (2004). Suppression subtractive hybridization and microarray identification of estrogen-regulated hypothalamic genes. *Neurochem Res* **29**: 1189-200.

- Mameza, M. G., Lockard, J. M., Zamora, E., Hillefors, M., Lavina, Z. S. and Kaplan, B. B. (2007). Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions. *J Neurochem* **103**: 927-41.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S. J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A. L., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**: 458-71.
- Mann, S. S. and Hammarback, J. A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* **269**: 11492-7.
- Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H. and Watson, S. J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* **18**: 22-9.
- Mansuy-Schlick, V., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. and Boireau, W. (2006a). Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements. *Biosens Bioelectron* **21**: 1830-7.
- Mansuy-Schlick, V., Tolle, F., Delage-Mourroux, R., Fraichard, A., Risold, P. Y. and 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**: 83-7.
- Mansuy, V., Boireau, W., Fraichard, A., Schlick, J. L., Jouvenot, M. and Delage-Mourroux, R. (2004). GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 639-48.
- Mansuy, V., Geller, S., Rey, J. P., Campagne, C., Boccard, J., Poulain, P., Prevot, V. and Pralong, F. P. (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. and Pralong, F. P. (2009). Expression of the GABAA receptor associated protein Gec1 is circadian and dependent upon the cellular clock machinery in GnRH secreting GnV-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* **307**: 68-76.
- Mao, K. and Klionsky, D. J. (2011). AMPK Activates Autophagy by Phosphorylating ULK1. *Circ Res* **108**: 787-8.
- Marino, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N. and Lopez-Otin, C. (2007). Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* **282**: 18573-83.
- Marsden, K. C., Beattie, J. B., Friedenthal, J. and Carroll, R. C. (2007). NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA(A) receptors. *J Neurosci* **27**: 14326-37.
- Massey, A. C., Zhang, C. and Cuervo, A. M. (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* **73**: 205-35.
- Meldrum, B. S. and Rogawski, M. A. (2007). Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* **4**: 18-61.

Miao, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Chen, L. and Wang, F. (2010). GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatogastroenterology* **57**: 257-61.

Michels, G. and Moss, S. J. (2007). GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**: 3-14.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**: 66-71.

Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H. R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D. and Harris, A. L. (2009). The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res* **69**: 4415-23.

Mimnaugh, E. G., Xu, W., Vos, M., Yuan, X., Isaacs, J. S., Bisht, K. S., Gius, D. and Neckers, L. (2004). Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **3**: 551-66.

Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K. I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S. J., Yamamoto, T., Nabekura, J. and Hirata, M. (2007). Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface. *J Neurosci* **27**: 1692-701.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. and Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-75.

Modi, S., Stopeck, A. T., Linden, H. M., Solit, D. B., Chandarlapaty, S., Rosen, N., D'Andrea, G., Dickler, M. N., Moynahan, M. E., Sugarman, S., Ma, W., Patil, S., Norton, L., Hannah, A. L. and Hudis, C. (2011). HSP90 Inhibition is Effective in Breast Cancer: A Phase 2 Trial of Tanespimycin (17AAG) plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab. *Clin Cancer Res*: sous presse.

Mohrluder, J., Hoffmann, Y., Stangler, T., Hanel, K. and Willbold, D. (2007). Identification of clathrin heavy chain as a direct interaction partner for the gamma-aminobutyric acid type A receptor associated protein. *Biochemistry* **46**: 14537-43.

Mohrluder, J., Schwarten, M. and Willbold, D. (2009). Structure and potential function of gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein. *FEBS J* **276**: 4989-5005.

Morgan, G. J., Davies, F. E., Cavenagh, J. D. and Jackson, G. H. (2008). Position statement on the use of bortezomib in multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* **30**: 1-10.

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J. M., Criollo, A., Maiuri, M. C. and Kroemer, G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1524-32.

Muller, J. M., Shorter, J., Newman, R., Deinhardt, K., Sagiv, Y., Elazar, Z., Warren, G. and Shima, D. T. (2002). Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex

assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion. *J Cell Biol* **157**: 1161-73.

Muller, L., Schaupp, A., Walerych, D., Wegele, H. and Buchner, J. (2004). Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J Biol Chem* **279**: 48846-54.

Nakamura, T., Hayashi, T., Mimori-Kiyosue, Y., Sakaue, F., Matsuura, K., Iemura, S., Natsume, T. and Akiyama, T. (2010). The PX-RICS-14-3-3zeta/theta complex couples N-cadherin-beta-catenin with dynein-dynactin to mediate its export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **285**: 16145-54.

Nakamura, T., Hayashi, T., Nasu-Nishimura, Y., Sakaue, F., Morishita, Y., Okabe, T., Ohwada, S., Matsuura, K. and Akiyama, T. (2008). PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/beta-catenin complex. *Genes Dev* **22**: 1244-56.

Natali, P. G., Nicotra, M. R., Sures, I., Mottolese, M., Botti, C. and Ullrich, A. (1992). Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer* **52**: 713-7.

Nemos, C., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. and 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**: 109-22.

Nemos, C., Mansuy, V., Vernier-Magnin, S., Fraichard, A., Jouvenot, M. and 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**: 216-9.

Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A. and Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**: 515-27.

Nielsen, N. H., Loden, M., Cajander, J., Emdin, S. O. and Landberg, G. (1999). G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome. *Breast Cancer Res Treat* **56**: 105-12.

Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M. and Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 5367-74.

Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Lohr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A. S., Terzic, J., Dotsch, V., Ney, P. A. and Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**: 45-51.

- Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pebusque, M. J., Vaccaro, M. I., Velasco, G., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2009). The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **20**: 870-81.
- Nymann-Andersen, J., Wang, H. and Olsen, R. W. (2002). Biochemical identification of the binding domain in the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) mediating dimer formation. *Neuropharmacology* **43**: 476-81.
- O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K. and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* **18**: 1859-75.
- O'Malley, B. W. (2005). A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol* **19**: 1402-11.
- O'Sullivan, G. A., Kneussel, M., Elazar, Z. and Betz, H. (2005). GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* **22**: 2644-8.
- Oh, S., Xiaofei, E., Ni, D., Pirooz, S. D., Lee, J. Y., Lee, D., Zhao, Z., Lee, S., Lee, H., Ku, B., Kowalik, T., Martin, S. E., Oh, B. H., Jung, J. U. and Liang, C. (2011). Downregulation of autophagy by Bcl-2 promotes MCF7 breast cancer cell growth independent of its inhibition of apoptosis. *Cell Death Differ* **18**: 452-64.
- Okazaki, N., Yan, J., Yuasa, S., Ueno, T., Kominami, E., Masuho, Y., Koga, H. and 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.
- Pacheco, V., Ma, P., Thielmann, Y., Hartmann, R., Weiergraber, O. H., Mohrluder, J. and Willbold, D. (2010). Assessment of GABARAP self-association by its diffusion properties. *J Biomol NMR* **48**: 49-58.
- Paik, J. H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., Jiang, S., Gilliland, D. G., Chin, L., Wong, W. H., Castrillon, D. H. and DePinho, R. A. (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* **128**: 309-23.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**: 24131-45.
- Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M. and Codogno, P. (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **90**: 313-23.
- Paz, Y., Elazar, Z. and Fass, D. (2000). Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem* **275**: 25445-50.
- Pellerin, I., Vuillermoz, C., Jouvenot, M., Ordener, C., Royez, M. and Adessi, G. L. (1993a). Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* **90**: R17-21.

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

Pellerin, I., Vuillermoz, C., Jouvenot, M., Royez, M., Ordener, C., Marechal, G. and Adessi, G. (1992). Superinduction of c-fos gene expression by estrogen in cultured guinea-pig endometrial cells requires priming by a cycloheximide-dependent mechanism. *Endocrinology* **131**: 1094-100.

Periyasamy-Thandavan, S., Jackson, W. H., Samaddar, J. S., Erickson, B., Barrett, J. R., Raney, L., Gopal, E., Ganapathy, V., Hill, W. D., Bhalla, K. N. and Schoenlein, P. V. (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.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-52.

Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1640-8.

Pick, E., Kluger, Y., Giltnane, J. M., Moeder, C., Camp, R. L., Rimm, D. L. and Kluger, H. M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* **67**: 2932-7.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* **117**: 3155-63.

Pratt, W. B. and Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**: 306-60.

Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Paish, E. C., Lee, A. H. and Ellis, I. O. (2007). Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* **50**: 434-8.

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

Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G. and Cohen, P. (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* **274**: 17179-83.

Reppert, S. M. and Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-41.

Richardson, P. G., Mitsiades, C. S., Laubach, J. P., Lonial, S., Chanan-Khan, A. A. and Anderson, K. C. (2011). Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *Br J Haematol* **152**: 367-79.

Ripperger, J. A. and Schibler, U. (2001). Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 357-62.

- Roberts, S. S., Mendonca-Torres, M. C., Jensen, K., Francis, G. L. and Vasko, V. (2009). GABA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Pathol Oncol Res* **15**: 645-50.
- Roberts, S. S., Mori, M., Pattee, P., Lapidus, J., Mathews, R., O'Malley, J. P., Hsieh, Y. C., Turner, M. A., Wang, Z., Tian, Q., Rodland, M. J., Reynolds, C. P., Seeger, R. C. and Nagalla, S. R. (2004). GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **22**: 4127-34.
- Robinson, L. J., Aniento, F. and Gruenberg, J. (1997). NSF is required for transport from early to late endosomes. *J Cell Sci* **110**: 2079-87.
- Rories, C. and Spelsberg, T. C. (1989). Ovarian steroid action on gene expression: mechanisms and models. *Annu Rev Physiol* **51**: 653-81.
- Ross, J. S. and Gray, G. S. (2003). Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev* **17**: 333-40.
- Rothman, J. E. (1994). Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**: 81-96.
- Roy, S. and Debnath, J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol* **32**: 383-96.
- Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D. S., Zhang, L. V., Wong, S. L., Franklin, G., Li, S., Albala, J. S., Lim, J., Fraughton, C., Llamasas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R. S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H. Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M. E., Hill, D. E., Roth, F. P. and Vidal, M. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**: 1173-8.
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J. and 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**: 11217-22.
- Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A. and Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* **19**: 1494-504.
- 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. and Takiguchi, M. (2003). Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem* **278**: 30450-7.
- Salih, D. A. and Brunet, A. (2008). FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 126-36.
- Salmena, L., Carracedo, A. and Pandolfi, P. P. (2008). Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**: 403-14.

- Salvi, R., Castillo, E., Voirol, M. J., Glauser, M., Rey, J. P., Gaillard, R. C., Vollenweider, P. and Pralong, F. P. (2006). Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* **147**: 816-26.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N. D., Lozano, J., Saint, F. and Cordon-Cardo, C. (2006). Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* **24**: 778-89.
- Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R. and Steinbiss, H. H. (1995). Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs. *Biotechniques* **19**: 196-8, 200.
- Schibler, U., Ripperger, J. and Brown, S. A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* **18**: 250-60.
- Schnack, C., Danzer, K. M., Hengerer, B. and 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**: 1450-7.
- Schwarten, M., Mohrluder, J., Ma, P., Stoldt, M., Thielmann, Y., Stangler, T., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R. and Willbold, D. (2009). Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* **5**: 690-8.
- Seiliez, I., Gutierrez, J., Salmeron, C., Skiba-Cassy, S., Chauvin, C., Dias, K., Kaushik, S., Tesseraud, S. and 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**: 258-66.
- Sengupta, A., Molkenin, J. D., Paik, J. H., Depinho, R. A. and Yutzey, K. E. (2011). FoxO Transcription Factors Promote Cardiomyocyte Survival upon Induction of Oxidative Stress. *J Biol Chem* **286**: 7468-78.
- Sengupta, A., Molkenin, J. D. and Yutzey, K. E. (2009). FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**: 28319-31.
- Sharp, S. and Workman, P. (2006). Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res* **95**: 323-48.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. and Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* **16**: 869-71.
- Simunovic, F., Yi, M., Wang, Y., Stephens, R. and Sonntag, K. C. (2010). Evidence for gender-specific transcriptional profiles of nigral dopamine neurons in Parkinson disease. *PLoS One* **5**: e8856.
- Sobin, L. H. and Compton, C. C. (2010). TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* **116**: 5336-9.

Sorlie, T. (2007). Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. *Methods Mol Biol* **360**: 91-114.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. and Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-74.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lonning, P. E., Brown, P. O., Borresen-Dale, A. L. and Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8418-23.

Sorlie, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R. R. and Borresen-Dale, A. L. (2006). Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* **7**: 127.

Sreedhar, A. S., Kalmar, E., Csermely, P. and Shen, Y. F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* **562**: 11-5.

Storvik, M., Arguel, M. J., Schmieder, S., Delerue-Audegond, A., Li, Q., Qin, C., Vital, A., Bioulac, B., Gross, C. E., Wong, G., Nahon, J. L. and Bezdard, E. (2010). Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* **38**: 386-94.

Strnad, P., Zatloukal, K., Stumptner, C., Kulaksiz, H. and Denk, H. (2008). Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. *Biochim Biophys Acta* **1782**: 764-74.

Subramani, S. and Farre, J. C. (2007). A ubiquitin-like protein involved in membrane fusion. *Cell* **130**: 18-20.

Sugawara, K., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Inagaki, F. (2004). The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* **9**: 611-8.

Tang, Z. Y., Wu, Y. L., Gao, S. L. and Shen, H. W. (2008). Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells. *J Surg Res* **145**: 111-23.

Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T. and 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**: 13739-44.

Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T. and Kominami, E. (2001). The human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem* **276**: 1701-6.

- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2503-18.
- Thielmann, Y., Weiergraber, O. H., Ma, P., Schwarten, M., Mohrluder, J. and Willbold, D. (2009). Comparative modeling of human NSF reveals a possible binding mode of GABARAP and GATE-16. *Proteins* **77**: 637-46.
- Thorslund, T. and West, S. C. (2007). BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* **26**: 7720-30.
- Till, A. and Subramani, S. (2010). A balancing act for autophagin. *J Clin Invest* **120**: 2273-6.
- Tolle, F. (2008). Le gène *gec1* : expression dans le système nerveux central, estrogéno-dépendance et rôle dans l'oncogénèse. Université de Franche-Comté-Besançon.
- Tolle, F., Risold, P. Y., Mansuy-Schlick, V., Rossi, E., Boyer-Guittaut, M., Fraichard, A. and Jouvenot, M. (2008). Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* **1210**: 103-15.
- Tretter, V. and Moss, S. J. (2008). GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* **1**: 7.
- Turner, N. C., Reis-Filho, J. S., Russell, A. M., Springall, R. J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C. E., Schmitt, F. C., Ashworth, A. and Tutt, A. N. (2007). BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**: 2126-32.
- Usmani, S. Z., Bona, R. and Li, Z. (2009). 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer--from bench to bedside. *Curr Mol Med* **9**: 654-64.
- Vadlamudi, R. K., Joung, I., Strominger, J. L. and Shin, J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **271**: 20235-7.
- van der Horst, A. and Burgering, B. M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 440-50.
- Vasudevan, N. and Pfaff, D. W. (2008). Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* **29**: 238-57.
- Vernier-Magnin, S., Muller, S., Sallot, M., Radom, J., Musard, J. F., Adami, P., Dulieu, P., Remy-Martin, J. P., Jouvenot, M. and Fraichard, A. (2001). A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 118-25.
- Vernier-Magnin, S., Nemos, C., Mansuy, V., Tolle, F., Guichard, L., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. and Fraichard, A. (2005). Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1*/GABARAPL1 gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 23-31.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E. and Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**: 953-90.

Walerych, D., Kudla, G., Gutkowska, M., Wawrzynow, B., Muller, L., King, F. W., Helwak, A., Boros, J., Zylicz, A. and Zylicz, M. (2004). Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **279**: 48836-45.

Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J. and Olsen, R. W. (1999). GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**: 69-72.

Wang, H. and Olsen, R. W. (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**: 644-55.

Wang, Y., Dun, S. L., Huang, P., Chen, C., Chen, Y., Unterwald, E. M., Dun, N. J., Van Bockstaele, E. J. and Liu-Chen, L. Y. (2006). Distribution and ultrastructural localization of GEC1 in the rat CNS. *Neuroscience* **140**: 1265-76.

Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V. and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* **29**: 1792-802.

Whiteheart, S. W. and Matveeva, E. A. (2004). Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Struct Biol* **146**: 32-43.

Wiechmann, L. and Kuerer, H. M. (2008). The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer* **112**: 2130-42.

Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. and et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* **265**: 2088-90.

Wu, W. K., Wu, Y. C., Yu, L., Li, Z. J., Sung, J. J. and Cho, C. H. (2008). Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **374**: 258-63.

Xie, Z. and Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102-9.

Xin, Y., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Fu, Q., Jiang, J., Zhang, P., Gong, R. and Zhao, S. (2001). Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* **74**: 408-13.

Xu, H., Ju, D., Jarois, T. and Xie, Y. (2008). Diminished feedback regulation of proteasome expression and resistance to proteasome inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **107**: 267-74.

Yang, C. H., Gonzalez-Angulo, A. M., Reuben, J. M., Booser, D. J., Pusztai, L., Krishnamurthy, S., Esseltine, D., Stec, J., Broglio, K. R., Islam, R., Hortobagyi, G. N. and Cristofanilli, M. (2006a). Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Ann Oncol* **17**: 813-7.

Yang, J. Y. and Hung, M. C. (2011). Deciphering the Role of Forkhead Transcription Factors in Cancer Therapy. *Curr Drug Targets*:

Yang, J. Y. and Hung, M. C. (2009). A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 752-7.

Yang, J. Y., Zong, C. S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J. Y., Lai, C. C., Chang, C. J., Huang, W. C., Huang, H., Kuo, H. P., Lee, D. F., Li, L. Y., Lien, H. C., Cheng, X., Chang, K. J., Hsiao, C. D., Tsai, F. J., Tsai, C. H., Sahin, A. A., Muller, W. J., Mills, G. B., Yu, D., Hortobagyi, G. N. and Hung, M. C. (2008). ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* **10**: 138-48.

Yang, W., Monroe, J., Zhang, Y., George, D., Bremer, E. and Li, H. (2006b). Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett* **243**: 217-27.

Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 124-31.

Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepkka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. and Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5339-46.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. and Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**: 1124-32.

Zajac, M., Moneo, M. V., Carnero, A., Benitez, J. and Martinez-Delgado, B. (2008). Mitotic catastrophe cell death induced by heat shock protein 90 inhibitor in BRCA1-deficient breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* **7**: 2358-66.

Zhang, J. and Ney, P. A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* **16**: 939-46.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K. and Gustafsson, J. A. (2010). Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. *J Biol Chem* **285**: 39575-9.

Zhao, H., Langerod, A., Ji, Y., Nowels, K. W., Nesland, J. M., Tibshirani, R., Bukholm, I. K., Karesen, R., Botstein, D., Borresen-Dale, A. L. and Jeffrey, S. S. (2004). Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol Biol Cell* **15**: 2523-36.

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H. and Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**: 472-83.

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A. and Goldberg, A. L. (2008). Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. *Autophagy* **4**: 378-80.

ANNEXES

*I) REVUE
PUBLICATION IV*

*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.

** Contribution égale au travail.*

Autophagy, sous presse (octobre 2011).

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-APKARIGDLDDKRYLVPSDLTVGQF-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-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESIVYGL-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESIVYGL-117
GABARAPL2	MWIIRKRIQLPSEKATIFLVFD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYSAGENTFGF-117
LC3A	VKIIRRLQLNPTQAFLLVNHQSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYMVYASQETFGF-125
LC3B	IKIIRRLQLNANQAFLLVNHGSMVSVSTPISEVYSEKDEDGFLYMVYASQETFGMKLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVLRATEAFYLLVNNKSLVMSATMAEIRDYKDEDGFVMTYASQETFGCLESAAPRDGSSELEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRIMLPPEKATIFIFVN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFLYVTVSAGENTFGR-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

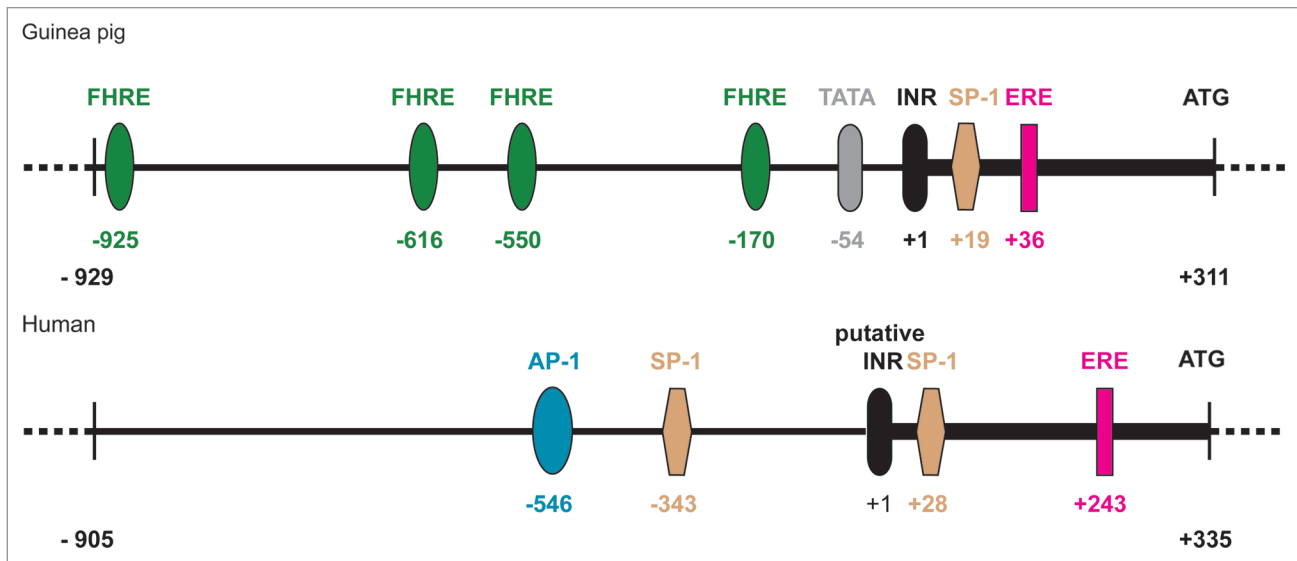


Figure 2. Comparison of the human and guinea pig *GABARAPL1* gene promoter regions. Predictive computer analysis was conducted on promoter sequences. In the guinea pig gene, the INR element is sufficient to direct transcription and the ERE located in the first exon permits induction of the gene by Estradiol-17 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 R 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

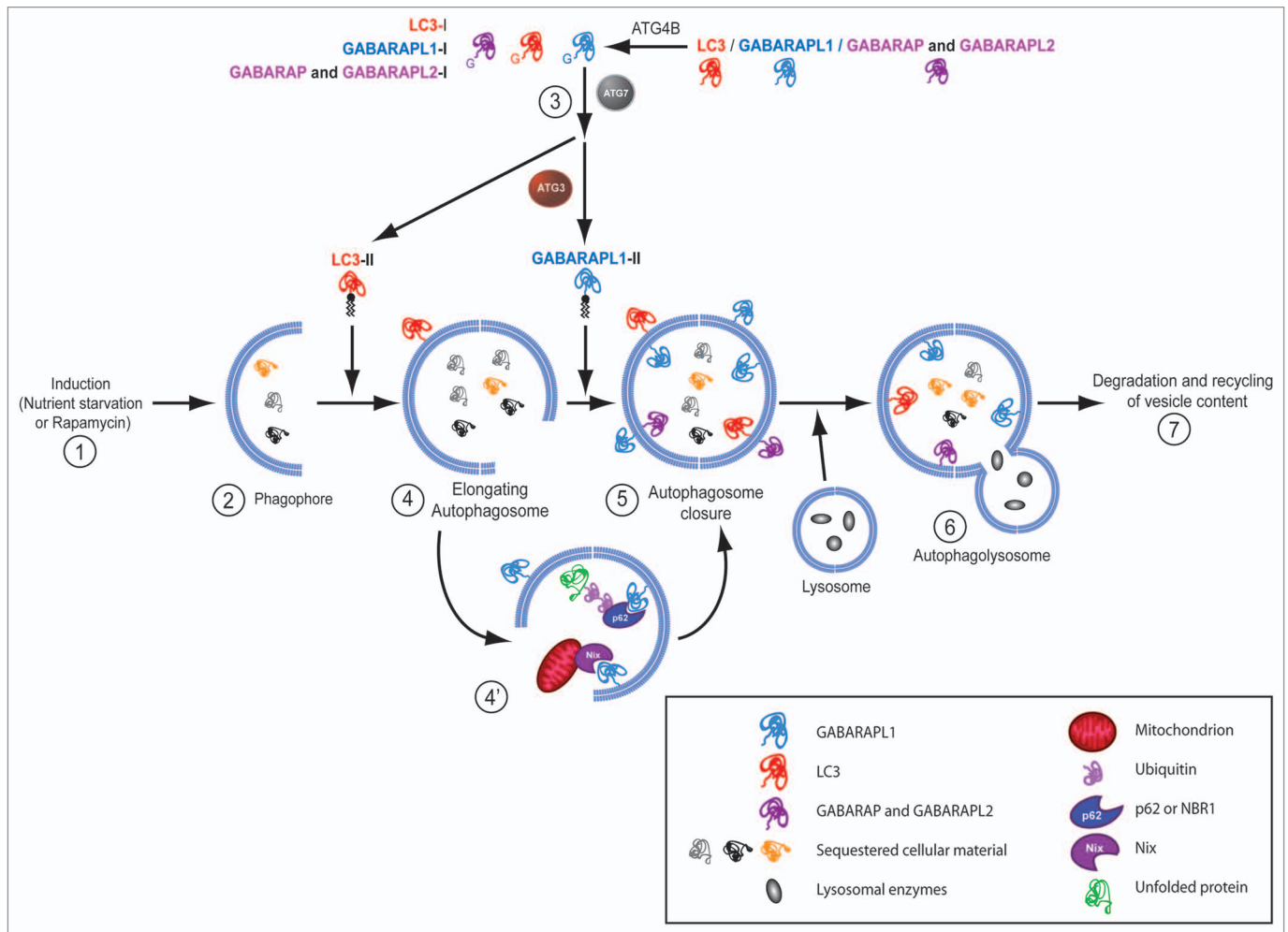


Figure 3. Role of GABARAPL1 in autophagy. GABARAP, GABARAPL2 and LC3 are cleaved in the cell by Atg4 enzymes to produce their mature forms; GABARAPL1-I, GABARAP-I, GABARAPL2-I and LC3-I. Under autophagy-inducing conditions (e.g., stimulation with rapamycin or nutrient starvation) (1), nucleation of phagophores 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, *Lc3β* knockout mice do not display a compensation of *Lc3α* 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}

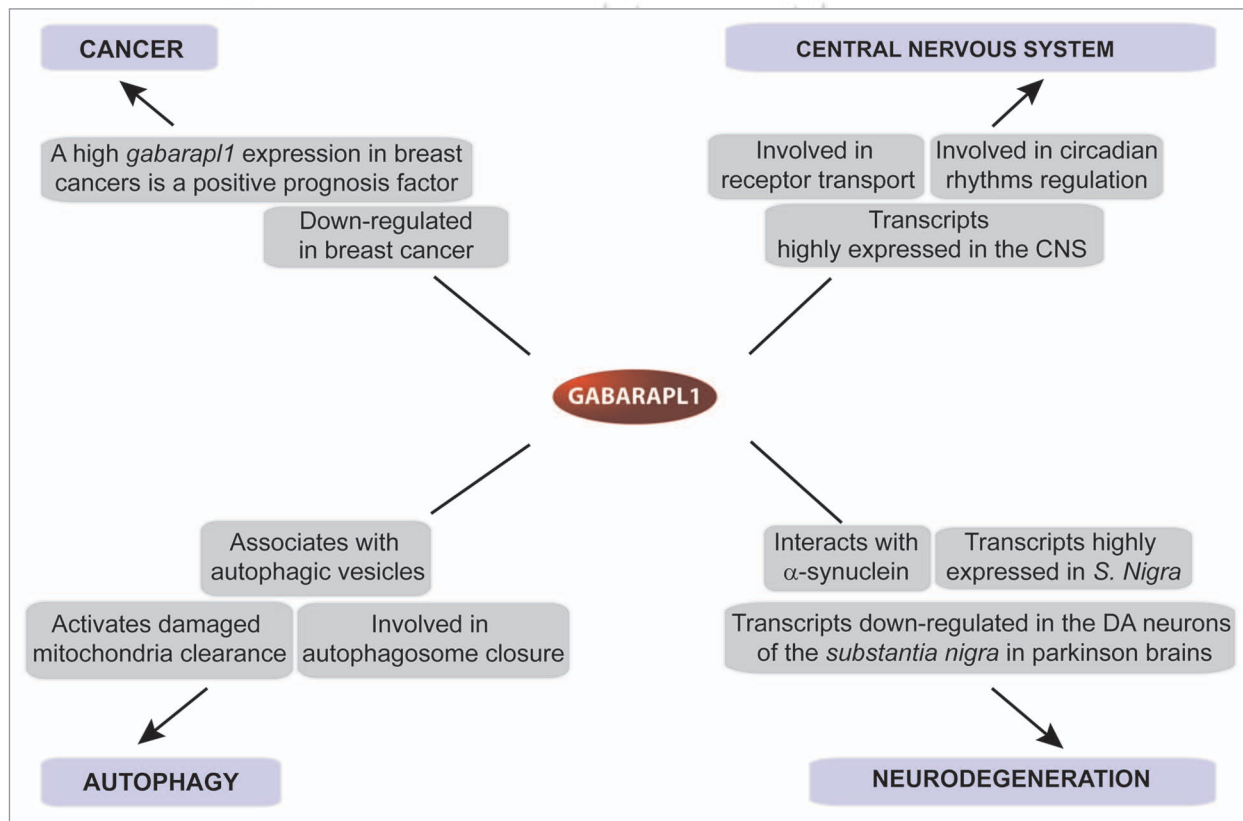


Figure 4. Confirmed and putative roles of GABARAPL1. Schematic illustration of described or putative roles for GABARAPL1 and regulation of *Gab-arapl1* gene and GABARAPL1 protein in physiological processes or pathologies.

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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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; PMID: 11060023; DOI:10.1093/emboj/19.21.5720.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. 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* 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-Guitaut 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, Molkenin 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, Molkenin 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, Masiere 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. *Hepatogastroenterology* 57:257-61; 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; 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, Tagliabracchi 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.

Copyright Clearance Center
 Do not distribute.

II) LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

1) **S. Seguin**, A. Berthier, F.Z. Chakrama, F. Descotes, G. Lucchi, P. Ducoroy, W. Boireau, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, A. Fraichard et R. Delage-Mourroux. Etude du rôle de *gec1* dans la progression tumorale et identification de nouveaux partenaires cellulaires de la protéine GEC1. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France, *juin 2009*.

2) **S. Seguin**, A. Berthier, F.Z. Chakrama, F. Descotes, G. Lucchi, P. Ducoroy, W. Boireau, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, A. Fraichard et R. Delage-Mourroux. Etude du rôle de *gec1* dans la progression tumorale par identification de nouveaux partenaires cellulaires de la protéine GEC1, Journée de la Plateforme Protéomique CLIPP, Besançon, France, *mai 2009*.

3) F.Z. Chakrama, **S. Seguin-Py**, J.N.Legrand, A. Fraichard, R.Delage-Mourroux, G.Despouy, V.Perez, M. Jouvenot and M. Boyer-Guittaut. Caractérisation du rôle de la protéine GABARAPL1 au cours de l'autophagie. Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France, *juin 2010*.

4) F.Z. Chakrama, **S.Seguin**, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot and M.Boyer-Guittaut. GEC1: Un nouvel effecteur de l'autophagie. Journée de l'IFR133, Besançon, France, *novembre 2009*.

5) F.Z. Chakrama, **S. Seguin**, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot et M. Boyer-Guittaut. Rôle de GEC1 au cours de l'autophagie. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France, *juin 2009*.

*III) LISTE DES
COMMUNICATIONS AFFICHÉES*

*1) GEC1: a new autophagy effector
regulating breast cancer cells
proliferation.*

S. Seguin, F.Z. Chakrama, A. Fraichard, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot
and R. Delage-Mourroux.

EMBO conference on Autophagy, Ascona, Suisse, octobre 2009.

GEC1 : a new autophagy effector regulating breast cancer cell proliferation

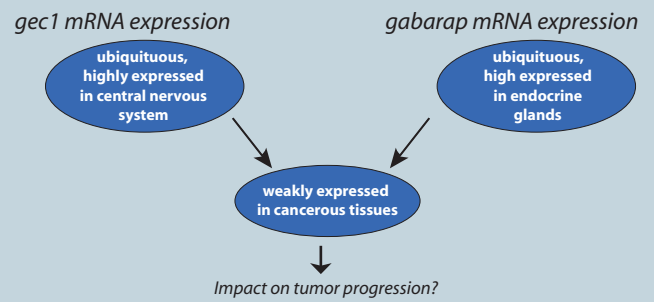
S.Seguin, F.Chakrama, # E. Jacquin, M.Boyer-Guittaut, M.Jouvenot, A.Fraichard and R.Delage-Mourroux
EA3922, Université de Franche-Comté, IFR133, UFR Sciences et Techniques, Laboratoire de Biochimie-Biologie Moléculaire, Besançon, FRANCE
EA3181, Université de Franche-Comté, IFR133, UFR SMP, CHU Jean Minjot, Besançon, FRANCE
E-mail: regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr

Introduction

- GEC1 = protein of 117 amino-acids, member of the GABARAP family (GABA_A receptor associated-protein)
- GEC1 interacts, like GABARAP, with the γ_2 subunit of GABA_A receptor and cytoskeleton elements
- The GEC1 protein shares a very high homology with the proteins GABARAP, GATE16 and LC3 which are known to be implicated in autophagy process

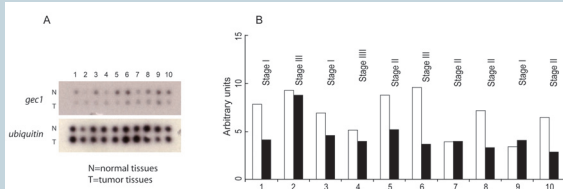
Aims:

- Study the role of GEC1 protein in tumor progression
- Determine the implication of GEC1 protein in the autophagy process



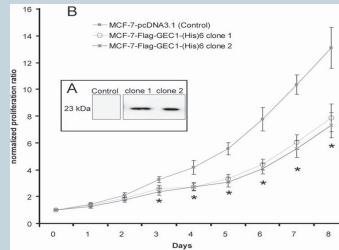
Results

gec1 expression is downregulated in breast tumors



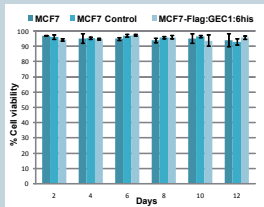
Autoradiography of the membrane hybridized with (A) *gec1* or *ubiquitin* probe. (B) Normalized *gec1* expression using the ubiquitin signal in normal (white bars) and tumoral breast tissues (black bars). The tumors at different stages correspond to infiltrating ductal carcinomas (1, 2, 4, 7, 8, 9 and 10), mucinous adenocarcinoma (3), Paget's disease (5), lobular carcinoma (6).

GEC1 overexpression negatively regulates the growth rate of MCF7 cells



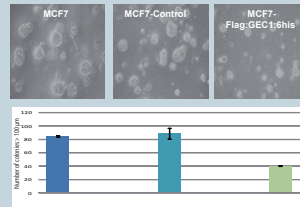
(A) Western blot analysis of MCF7-pcDNA3.1 (Control) and MCF7-Flag-GEC1-6his (clones 1 and 2) cells using an anti-Flag antibody. (B) Growth rate of MCF7-pcDNA3.1 (■) and MCF7-Flag-GEC1-6his clones 1 (○) and 2 (*) using an MTT assay. * p value < 0.05 (Wilcoxon test)

The viability of MCF7 cells is not decreased by the overexpression of GEC1



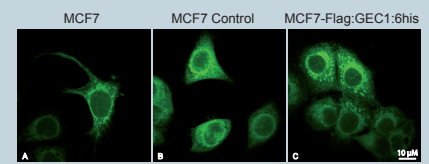
The cell viability was determined by the trypan blue exclusion method during 12 days for MCF7, MCF7 control and MCF7-Flag:GEC1:6his.

GEC1 overexpression decreased colony formation of MCF7 in soft agar



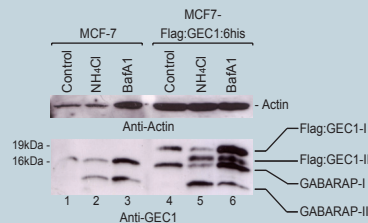
The ability to grow in semi-solid medium was studied for MCF7, MCF7 control and MCF7-Flag:GEC1:6his. The polystyrene flat bottom of wells was precoated with 1% Noble agar and cells were suspended in 0.3% Noble agar and cultured at 37°C. The number of clones (> 100 μ m) was counted by phase contrast microscopy after 21 days.

Overexpression of GEC1 in MCF7-Flag:GEC1:6his does not modify the level of basal autophagy



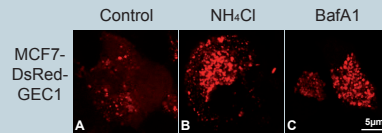
Levels of autophagy in MCF7, MCF7 Control and MCF7-Flag:GEC1:6his cells were quantified using MonoDansyl/Cadaverine (0.05 mM).

GEC1 is conjugated to phospholipids in the cells



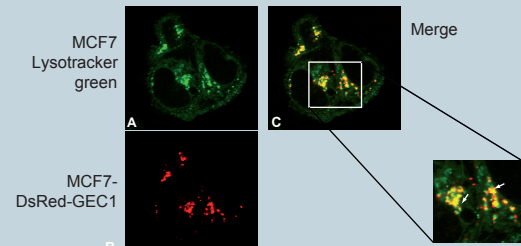
MCF7 and MCF7-Flag:GEC1:6his cells were cultured in DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH₄Cl for 2 h or 500 nM Bafilomycin (BafA1) for 24 h to inhibit lysosomal activity. Cells were then lysed and total proteins were separated on a 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GEC1 and anti-Actin antibodies and the ECL Plus reagent.

GEC1 accumulates in intracellular vesicles after inhibition of lysosomal activity



MCF7 cells overexpressing the DsRed-GEC1 protein were incubated in complete medium (Control) (A), DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH₄Cl for 2 h (B) or complete medium supplemented with 500 nM of BafA1 for 24 h (C). Cells were then fixed and analysed by confocal microscopy.

GEC1 is localized in the lysosomes in the MCF7-DsRed-GEC1 cells



MCF7 or MCF7-DsRed-GEC1 cells were incubated in complete medium supplemented with 50 nM Lysotracker green. Cells were analysed by confocal microscopy.

Conclusion

Our study showed, for the first time, that MCF7 cells overexpressing GEC1 protein had a significantly decreased growth rate. This finding was in favor of a potential role of GEC1 in the control of cell proliferation as previously reported for GABARAP overexpressed in CAL51 cells. Our experiments showed that this modification of the growth rate is not due to a decrease of the cell viability. In the macro-array experiment, most breast tumor tissues presented a weaker *gec1* mRNA level than normal tissues. This concurs with our previous findings in breast cancer cell lines where very low levels of *gec1* mRNAs were observed. Using different experimental assays, we demonstrated that GEC1 is involved in the autophagy process in MCF7 breast cancer cells. Nevertheless, further experiments are needed to explain the link between autophagy, GEC1 and its function within the cells. In particular, it would be of great interest to study the relative involvement of the different members of the GABARAP family in the autophagy process and the tumor progression.

*2) Etude du rôle de la protéine GEC1
par identification de nouveaux
partenaires cellulaires.*

S. Seguin, A. Berthier, F.Z. Chakrama, F. Descotes, G. Lucchi, P. Ducoroy,
W. Boireau, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, A. Fraichard et R. Delage-
Mourroux.

*36^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs 2009-Interactions biologiques, de la
molécule à la cellule, Nancy, France, août 2009.*

Etude du rôle de la protéine GEC1 et identification de nouveaux partenaires cellulaires

* S.Seguin, * A.Berthier, * F.Chakrama, # F.Descotes, ° G.Lucchi, ° P.Ducoroy, + W.Boireau, * M.Boyer-Guittaut, * M.Jouvenot, * A.Fraichard et * R.Delage-Mourroux

* Laboratoire de Biochimie-Biologie Moléculaire, Université de Franche-Comté, IFR133, UFR Sciences et Techniques, Besançon

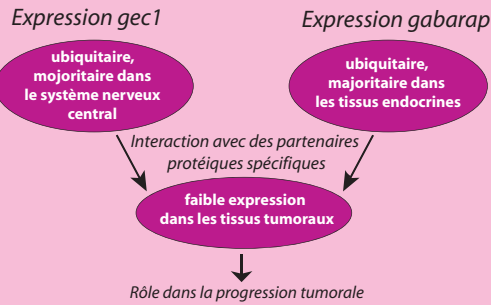
° CLIPP, 1 rue du Professeur Marion, BP 77980, 21079 DIJON

+ CLIPP, 32 avenue de l'Observatoire - 25044 BESANCON

Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Sud, Pavillon 3D, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69495 Pierre Bénite Cedex

Introduction

- GEC1 = protéine de 117 acides aminés, membre de la famille GABARAP (GABA_A receptor associated-protein)
- GEC1 interagit, comme GABARAP, avec la sous-unité γ_2 de GABA_A et la tubuline



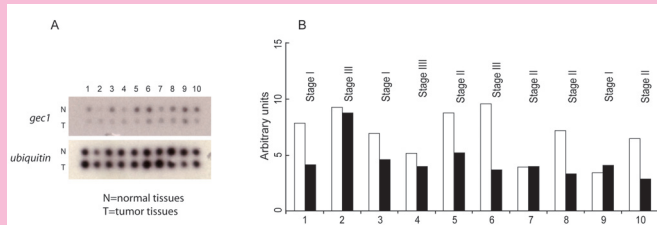
Objectifs:

- préciser le rôle de la protéine GEC1 dans la progression tumorale
- identifier de nouveaux partenaires protéiques de la protéine GEC1

Résultats

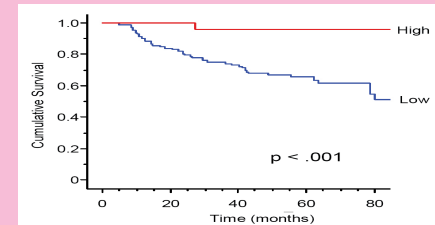
Implication de *gec1* dans les cancers

1. Expression de *gec1* par Macro-array dans des tissus normaux et tumoraux de sein



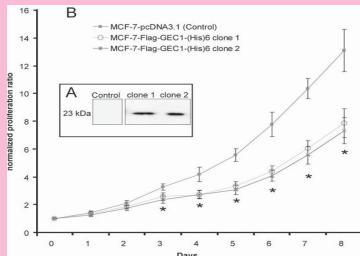
→ L'expression de *gec1* est diminuée dans les tissus tumoraux de sein

2. Expression de *gec1* par RT-PCR quantitative dans 265 tumeurs de sein



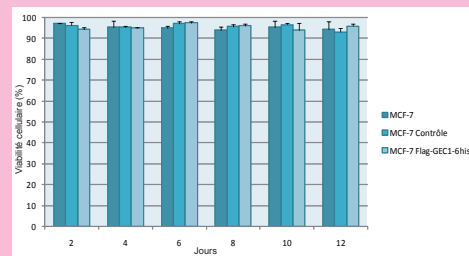
→ Une forte expression de *gec1* est associée à un meilleur devenir des patientes atteintes de cancer du sein

3. Test MTT sur les cellules MCF-7-FLAG-GEC1-6HIS



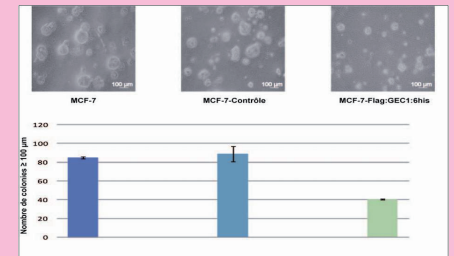
→ La surexpression de GEC1 diminue la prolifération des cellules MCF-7

4. Viabilité des cellules MCF-7-FLAG-GEC1-6HIS (numération au bleu trypan)



→ La surexpression de GEC1 ne diminue pas la viabilité des cellules MCF-7

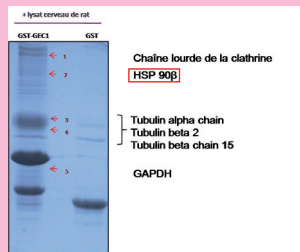
5. Croissance en agar mou des cellules MCF-7 FLAG-GEC1-6HIS



→ La surexpression de GEC1 diminue la croissance en agar mou des cellules MCF-7

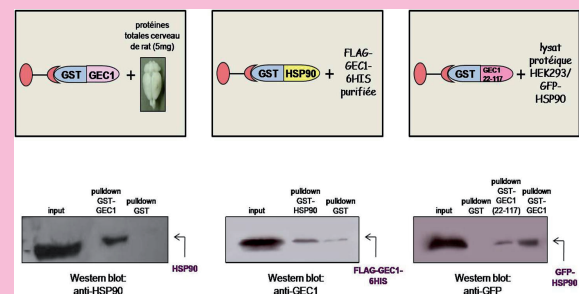
Identification de nouveaux partenaires protéiques de GEC1

1. Recherche de nouveaux partenaires de GEC1 par GST-pulldown couplée à la spectrométrie de masse



→ Plusieurs partenaires potentiels de GEC1 ont été identifiés dont la protéine HSP90

2. Etude de l'interaction GEC1/HSP90 par GST-pulldown



→ La protéine GEC1 interagit directement avec la protéine HSP90 *in vitro*

Conclusion

- Précision du rôle de *gec1* dans la progression tumorale
 - Faible expression de *gec1* dans les tissus cancéreux de sein.
 - Surexpression de *gec1* = facteur de bon pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.
 - Diminution de la prolifération et de la croissance en agar mou des cellules MCF-7 surexprimant GEC1.
 - Identification de nouveaux partenaires cellulaires de GEC1:
 - Interaction directe de GEC1 avec HSP90 *in vitro*. → Etude *in vivo*: expériences d'immunoprécipitation et d'immunolocalisation
- Etude *in vivo*: injection des cellules MCF-7 FLAG-GEC1-6HIS à des souris nude

*3) GABARAPL1 : a novel protein
associated with autophagic vesicles
and implicated in tumour progression.*

F.Z. Chakrama, E. Jacquin, **S. Seguin-Py**, J.N. Legrand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot and M. Boyer-Guittaut.

*68th Harden Conference Autophagy: from molecules to diseases,
Cirencester, Angleterre, septembre 2010.*

GABARAPL1: A novel protein associated with autophagic vesicles and implicated in tumor progression

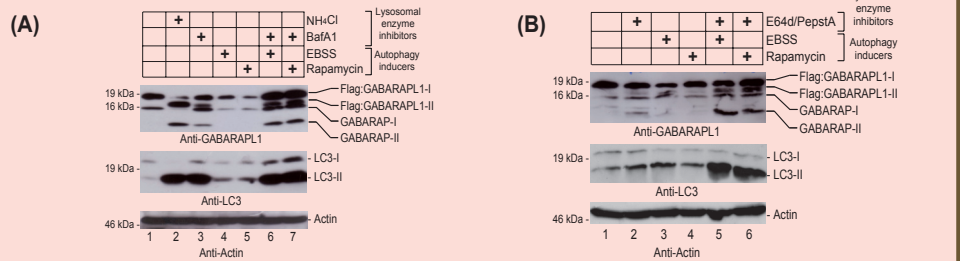
FZ. Chakrama, E. Jacquin, S. Seguin-Py, JN. Legrand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot and M. Boyer-Guittaut

* Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, Université de Franche-Comté, UFR-ST, Besançon, France

Introduction :

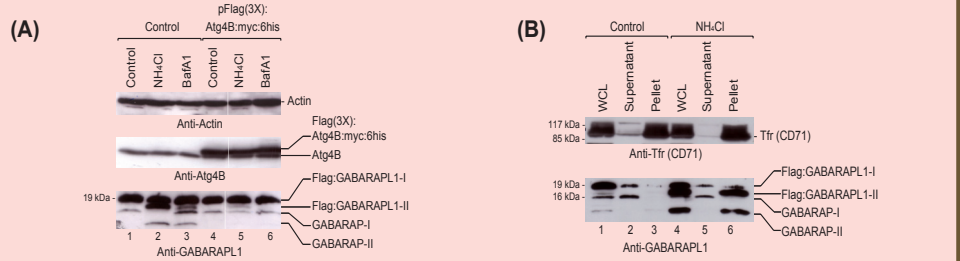
GABARAPL1 belongs to the GABARAP protein family due to its high sequence homology with GABARAP, GATE 16 and LC3. Several studies have shown that some proteins of GABARAP family are involved in autophagy, a mechanism of cellular degradation characterized by the formation of autophagosomes. We recently 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



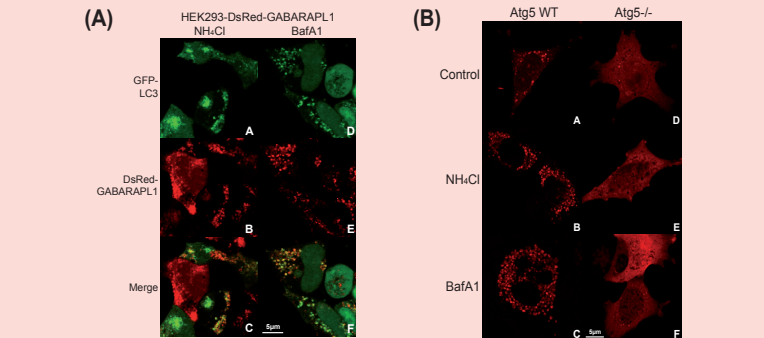
HEK293-Flag:GABARAPL1:6his cells were cultured in the presence of autophagy inducers (Rapamycine or EBSS) with or without (A) a lysosome inhibitor (BafA1) or (B) lysosomal enzyme inhibitors (E64d/PepstatinA). Total proteins were then immunoblotted using anti-GABARAPL1, anti-LC3 and anti-Actin antibodies.

Fig2: GABARAPL1 is delipidated by Atg4B and associates with vesicles



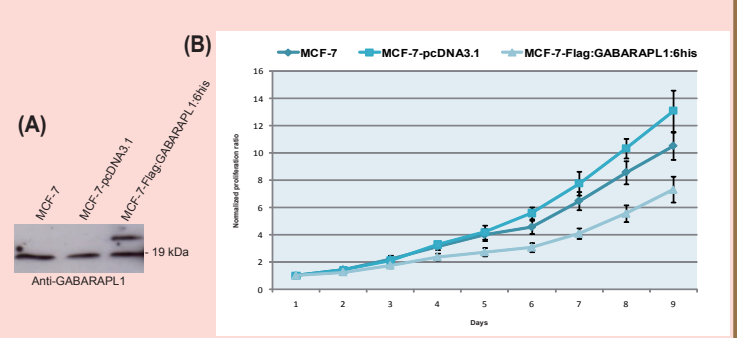
(A) HEK293-Flag:GABARAPL1:6his cells were transfected with a control or an Atg4B-expressing vector. 48 h later, cells were cultured with NH4Cl or BafA1. Total proteins were then immunoblotted using anti-GABARAPL1, anti-Actin and anti-Atg4B antibodies. (B) HEK293-Flag:GABARAPL1:6his cells were cultured with NH4Cl. Cell lysates were then ultracentrifugated at 100 000g for 1h and proteins were immunoblotted using anti-GABARAPL1 and anti-Tfr antibodies.

Fig3: GABARAPL1 associates with autophagosomes



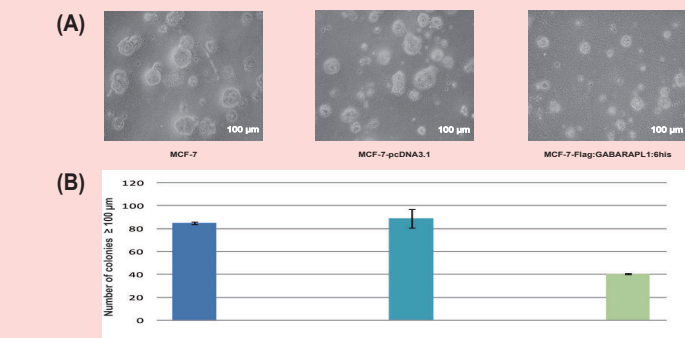
(A) HEK293-DsRed-GABARAPL1 cells were transfected with a GFP-LC3-expressing vector. 48h later, cells were incubated with NH4Cl (A, B, C) or BafA1 (D, E, F). (B) Atg5 WT and Atg5^{-/-} MEF cells were transfected with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector and treated as described in (A).

Fig4: GABARAPL1 inhibits MCF-7 proliferation rate



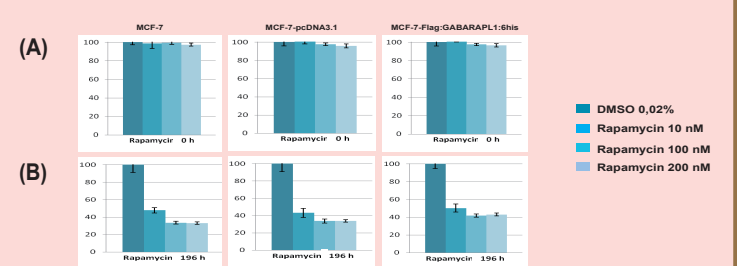
(A) Western blot analysis of MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and MCF-7-Flag:GABARAPL1:6his using an anti-GABARAPL1 antibody. (B) The proliferation rate of the MCF-7, MCF-7-pcDNA3.1 and MCF-7-Flag:GABARAPL1:6his cell lines was assessed using the MTT reagent.

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, MCF7-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 196 h (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*.

4) *GEC1 : a new autophagy effector
highly expressed in the CNS.*

F.Z. Chakrama, **S. Seguin**, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot
and M. Boyer-Guittaut.

EMBO conference on Autophagy, Ascona, Suisse, octobre 2009.

GEC1 (GABARAPL1) : a new effector of the autophagy process

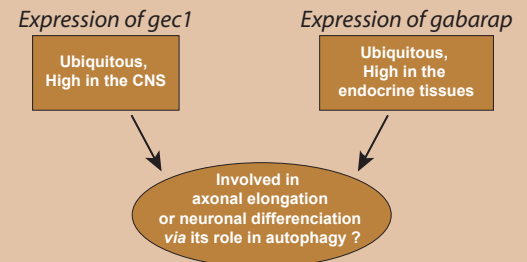
FZ. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot and **M. Boyer-Guittaut***

* Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, Université de Franche-Comté, UFR-ST, Besançon, France
Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr

Introduction :

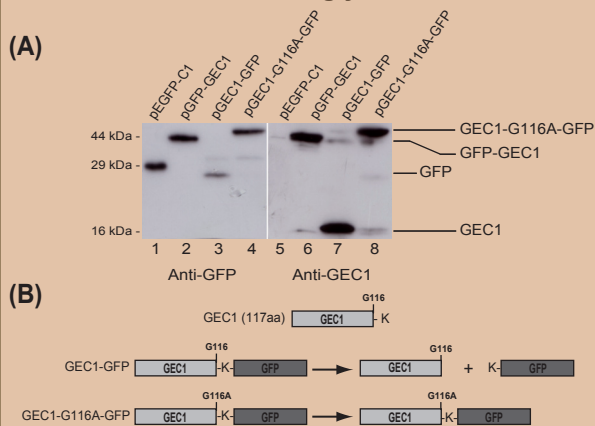
- GEC1 (117aa) shares 86% homology with GABARAP
- GEC1 is a member of the GABARAP family (GABA_A receptor associated protein)
- GEC1 interacts with GABA_AR and tubulin and promotes tubulin polymerization
- *gac1* mRNAs are detected in neurons involved in somatomotor and neuroendocrine functions but weakly expressed in sensory and reticular structures

Aim : Is GEC1, like GABARAP and LC3, involved in the autophagy process ?

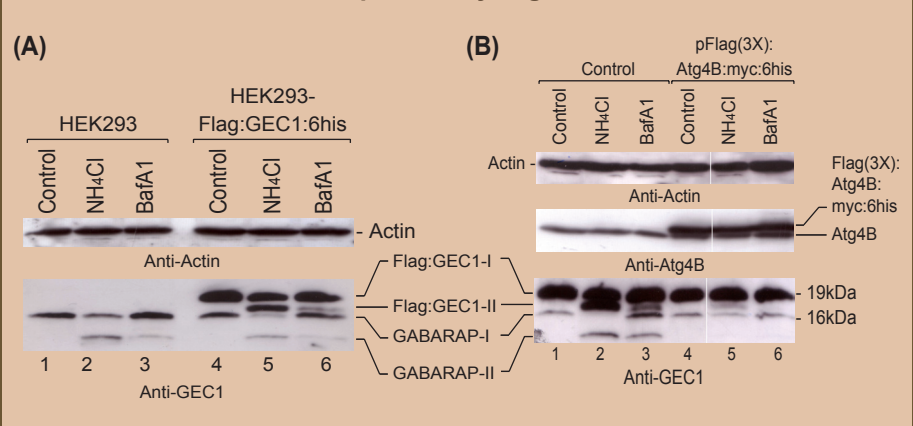


Results :

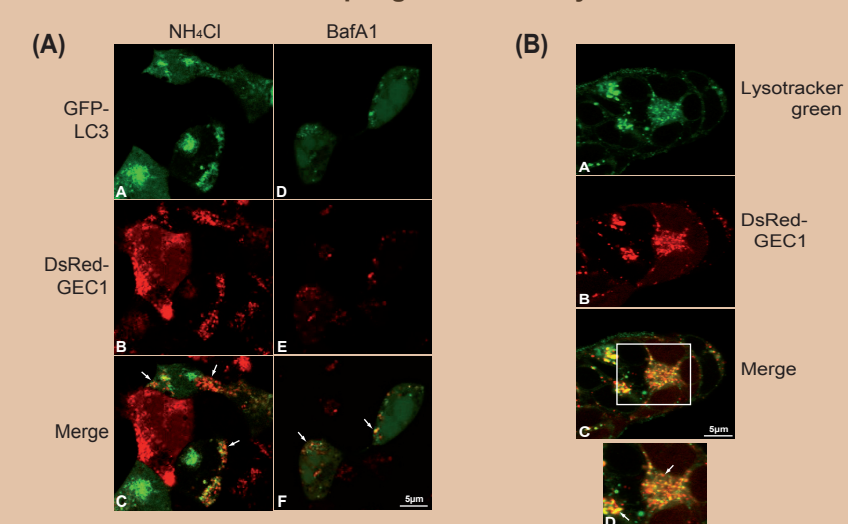
• GEC1 is cleaved at the glycine 116 in the cells



• GEC1 is modified and delipidated by Atg4B in the cells



• GEC1 is localized in autophagosomes and lysosomes in the cells



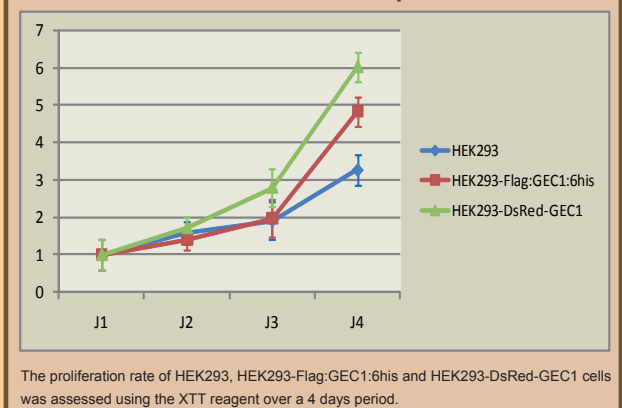
(A) HEK293-DsRed-GEC1 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector and then incubated in DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH₄Cl for 2 h (A, B, C) or in complete medium with 500 nM BafA1 for 24 h (D, E, F). (B) HEK293-DsRed-GEC1 cells were incubated in complete medium supplemented with 50 nM 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.

*5) GEC1 : a new Autophagy effector
highly expressed in the SNC.*

F.Z. Chakrama, **S. Seguin**, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot
and M. Boyer-Guittaut.

*IV Meeting on the molecular mechanisms of neurodegeneration, Milan, Italie,
mai 2009.*

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,

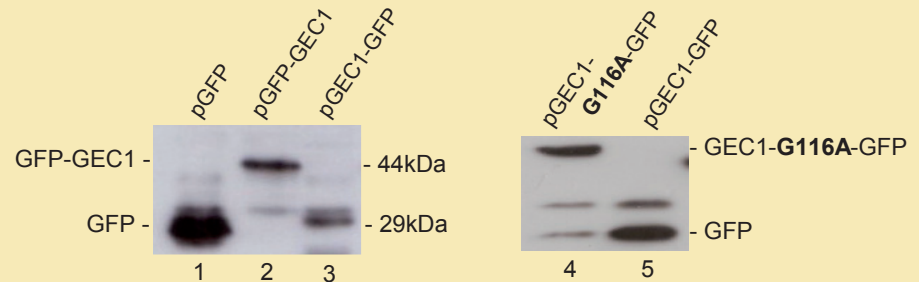
16 route de Gray, 25035 Besançon Cedex, France



Introduction

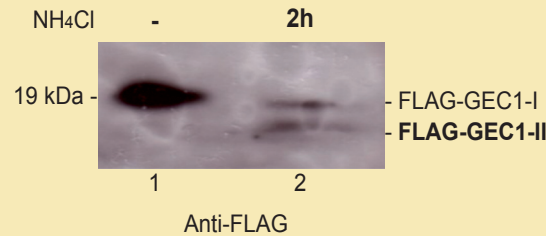
The gene *gec1* (Glandular epithelial cell 1) was first identified in our laboratory as an early and positively estrogen-regulated gene. The GEC1 protein (117aa) shares a very high homology with the proteins of the GABARAP family (GABA_A Receptor-Associated Protein) such as GABARAP, GATE16 and LC3. It has been demonstrated that, like GABARAP, GEC1 interacts with tubulin and the GABA_A receptor and promotes its intracellular transport. Furthermore, *gec1* mRNAs are highly expressed in the CNS (central nervous system), particularly in the pons and the diencephalon. In these structures, *gec1* 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



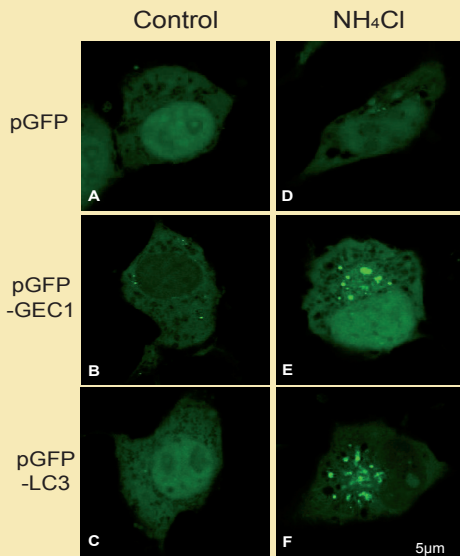
HEK293 cells were transfected with pGFP (1), pGFP-GEC1 (2), pGEC1-GFP (3,5) and pGEC1-G116A-GFP (4) vectors. 48h after transfection, cells were lysed and total proteins were separated on a 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti-GFP antibody and the ECL Plus reagent.

Fig. 2 : GEC1 is conjugated to phospholipids after induction of autophagy



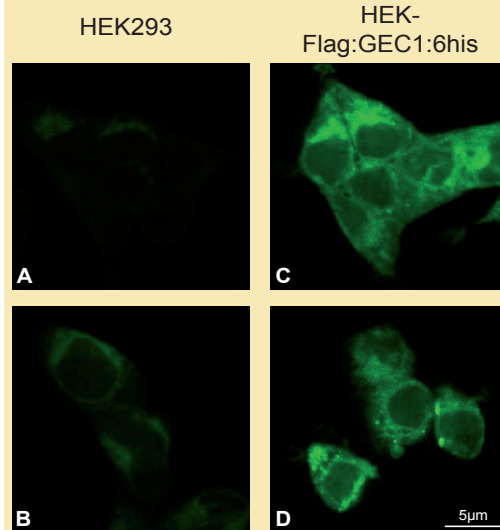
HEK-Flag:GEC1:6his cells were cultured in DMEM supplemented with 1% FCS and 50mM NH₄Cl for 2h to induce autophagy. Cells were then lysed and total proteins were separated on a 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti-Flag antibody and the ECL Plus reagent.

Fig. 3 : GFP-GEC1 is relocated into intracellular vesicles after induction of autophagy



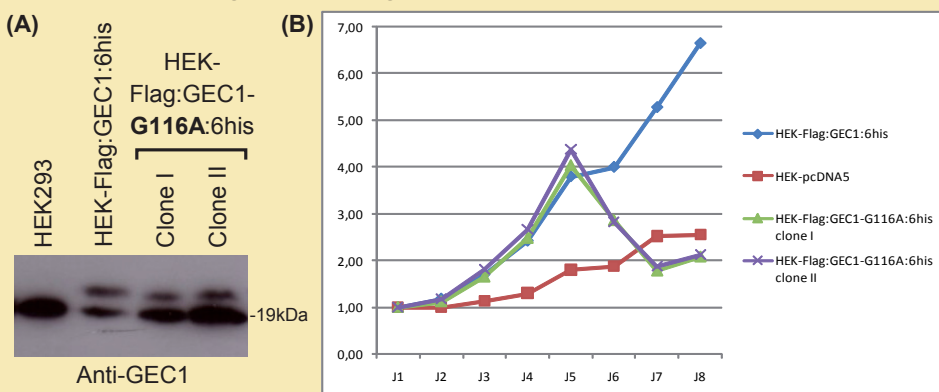
COS7 cells transfected with the pGFP, pGFP-GEC1 or pGFP-LC3 vector were incubated in complete medium (Control) (A,B,C) or complete medium supplemented with 50mM of NH₄Cl for 2h (Induced) (D,E,F). Cells were then analysed by confocal microscopy.

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, HEK-Flag:GEC1:6his and HEK-Flag:GEC1-G116A:6his cell lines were assessed using the MTT reagent.

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.

La protéine GEC1 (Glandular Epithelial Cell 1), appelée également GABARAPL1 (GABARAP like 1), présente de forts pourcentages d'identité avec les protéines GABARAP (GABA_A Receptor-Associated Protein), GATE-16 (Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 kDa) et Atg8 (Autophagy-related 8) ainsi qu'une identité moindre avec les protéines de la sous-famille LC3 (Light Chain 3). La protéine GABARAPL1 est largement exprimée dans tous les tissus, préférentiellement dans le système nerveux central, et intervient dans le transport intracellulaire des récepteurs GABA_A (Gamma-AminoButyric Acid type A receptor) et KOR (κ Opioid Receptor). De plus, notre équipe a mis en évidence une très faible expression du gène *gabapapll* dans diverses lignées cancéreuses, suggérant son implication dans la genèse et/ou la progression tumorale.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu pour objectifs : (1) de poursuivre la caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 en recherchant de nouveaux partenaires protéiques de GABARAPL1 et en participant au travail d'autres membres de l'équipe concernant l'étude du rôle de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie, (2) de préciser le rôle de *gabapapll* dans les cancers.

La recherche de partenaires protéiques a abouti à l'identification de différentes protéines. L'interaction entre GABARAPL1 et la protéine HSP90α/β (Heat Shock Protein 90α/β) nouvellement identifiée a été étudiée dans le cerveau de rat et dans les cellules MCF-7. Ainsi, nous avons montré que HSP90α/β protège GABARAPL1 de la dégradation par le protéasome.

Par ailleurs, il a été établi qu'au cours de l'autophagie, GABARAPL1 est clivée, maturée puis conjuguée à des phospholipides. Elle co-localise alors partiellement au niveau de lysosomes et d'autophagosomes.

Nous avons également démontré que *gabapapll* est faiblement exprimé dans les tissus tumoraux de sein et que la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS dans les cellules MCF-7 diminue considérablement leur croissance. De plus, une forte expression de *gabapapll* est corrélée à une augmentation de la survie de patientes atteintes de cancer du sein avec envahissement ganglionnaire.

L'ensemble de ces résultats a permis de clarifier le rôle intracellulaire de *gabapapll* tout en soulevant de nombreuses questions. Ainsi, de nouvelles perspectives de travail concernant la régulation de *gabapapll*, son implication dans les cancers et dans le processus d'autophagie s'offrent à présent aux membres de l'équipe.

The GEC1 (Glandular Epithelial Cell 1) protein, also named GABARAPL1 (GABARAP like 1) displays a high percentage of identity with the GABARAP (GABA_A Receptor-Associated Protein), GATE-16 (Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 kDa) and Atg8 (Autophagy-related 8) proteins, and a lesser identity with LC3 (Light Chain 3) family of proteins. The GABARAPL1 protein is widely expressed in all tissues, predominantly in the central nervous system and is involved in intracellular transport of GABA_A receptors (Gamma-AminoButyric Acid type A receptor) and KOR (κ Opioid Receptor). In addition, our team has shown a very low expression of the *gabapapll* gene in various cancer cell lines, suggesting its involvement in the genesis and/or progression of tumors.

As part of my thesis, I had the following objectives: (1) to pursue the functional characterization of the GABARAPL1 protein by seeking new protein partners of GABARAPL1 and participating in the study of the role of GABARAPL1 in the autophagic process and (2) to clarify the role of *gabapapll* in cancers.

The search for GABARAPL1 protein partners has led to the identification of different proteins. The interaction between GABARAPL1 and the protein partner : HSP90α/β (Heat Shock Protein 90α/β) was studied in rat brain and MCF-7 cells, in which we showed that HSP90α/β protects GABARAPL1 from degradation by the proteasome.

Additionally, it was established that during autophagy, GABARAPL1 is cleaved to its mature form and conjugated to phospholipids. It then co-localizes partially with lysosomes and autophagosomes.

We also demonstrated that *gabapapll* is weakly expressed in breast tumor tissues and that overexpression of the FLAG-GABARAPL1-6HIS recombinant protein in MCF-7 cells significantly reduces their growth. Finally, a strong expression of *gabapapll* is correlated with increased survival of patients with lymph node-positive breast cancer.

All these results helped to clarify the intracellular role of *gabapapll* while simultaneously raising many new questions. Thus identifying new opportunities for future researchers in the regulation of *gabapapll*, its involvement in cancers and in the autophagic process.