



HAL
open science

Etude du rôle des protéines QSOX1 et GABARAPL1 dans l'autophagie et le cancer

Laura Poillet Perez

► **To cite this version:**

Laura Poillet Perez. Etude du rôle des protéines QSOX1 et GABARAPL1 dans l'autophagie et le cancer. Cancer. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3020 . tel-01689980

HAL Id: tel-01689980

<https://theses.hal.science/tel-01689980>

Submitted on 22 Jan 2018

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 Environnements-Santé

ETUDE DU ROLE DES PROTEINES QSOX1 ET GABARAPL1 DANS L'AUTOPHAGIE ET LE CANCER

THESE

Soutenue le 8 Décembre 2015

Par

Laura POILLET PEREZ

Née le 06/10/1989 à Montbéliard (25)

Membres du Jury :

- **Rapporteurs :**

Dr. Souhila Medjkane, Maître de conférences, CNRS UMR7216, Paris

Dr. Patrice Codogno, Directeur de recherche, Institut Necker Enfants-Malades, Paris

- **Examineurs :**

Dr. Laurence Drubez-Daloz, Chargé de recherche, Inserm U866, Dijon

Dr. Renaud Legouis, Directeur de recherche, Centre de génétique moléculaire, Gif-sur-Yvette

- **Directeur de thèse :**

Pr. Régis Delage-Mourroux, Professeur des Universités, Université de Bourgogne Franche-Comté

- **Co-directeur de thèse :**

Dr. Gilles Despouy, Maître de conférences, Université de Bourgogne Franche-Comté

Remerciements

C'est avec une certaine émotion que j'écris aujourd'hui ces remerciements qui marque officiellement la fin de cette aventure qu'est la thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Patrice Codogno, le Dr. Souhila Medjkane, le Dr. Renaud Legouis et le Dr. Laurence Dubrez-Daloz d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je voudrais également remercier le Dr. Mathias Faure et le Dr. Laurent Delva d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Merci d'avoir suivi l'avancement de mes travaux au cours de ces trois années et merci pour vos conseils et votre aide concernant la thèse mais également le post doctorat.

Gilles, merci de m'avoir encadré pendant ces six mois de Master 2 et trois ans de thèse. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail de thèse. Merci également d'avoir été patient et à mon écoute lorsque le moral n'était pas là et d'avoir accepté ma grande « émotivité » (ou pleurs intempestifs ?!). J'ai beaucoup grandi et appris sur moi-même pendant cette thèse et c'est en grande partie grâce à toi.

Régis, merci également de m'avoir encadré durant ces trois ans de thèse. Merci pour tous tes conseils et ta patience. Merci de ne jamais avoir fermé ta porte malgré mes nombreuses irruptions dans ton bureau pour des questions (plus ou moins) importantes. Ton « don » pour te trouver au bon endroit au bon (mauvais ?) moment, nous a valu de nombreux fou rires.

Un énorme merci également à tous les autres membres du laboratoire EA3922 côté « La Bouloie », vous avez été une deuxième famille pour moi pendant ces presque 4 années. Karine, nous n'avons pas souvent eu l'occasion de travailler ensemble mais j'ai apprécié discuter avec toi pendant les temps de midi. Pascale, merci pour ta gentillesse, nous étions les dernières « QSOX1 », tes bons plats préparés pour nous avec amour et les nombreux mots appris de ton vocabulaire vont me manquer. Annick, mon soutien lors de mes migraines..., j'espère que tu auras une petite pensée pour moi lorsque tu prépareras de bon petit plat avec mon ancien robot. Michaël, un grand merci pour ton aide et tous tes conseils lors de ma thèse mais également lors de la recherche de post doc. Merci pour ta patience et ta gentillesse face à mes (très ?!) nombreuses questions et inquiétudes. Eric, merci pour tes conseils techniques, ton aide pour les expériences de l'article mais également tes nombreuses pâtisseries concoctées avec passion.

Paul, le dernier arrivé, nous n'avons pas passer beaucoup de temps ensemble mais je te remercie pour tous les conseils que tu as pu me donner pendant ce court temps. Bonne continuation au sein de l'EA3922 (attention il ne te reste plus que 4 ans pour t'adapter !).

Je voudrais également remercier les membres du laboratoire EA3922 côté « Haut de Chazal » que j'ai pu embêté lors de mes expériences d'immunofluorescence sur tumeurs. D'abord Pierre-Yves, merci de m'avoir accepté pour manipuler dans ton laboratoire, merci pour tes conseils expérimentés et ton humour. Merci également de nous avoir accueilli chaque année à ton étang pour le barbecue immanquable de l'EA3922. Gaby, merci pour ta gentillesse et du temps que tu m'as accordée lors de mes débuts au laboratoire. Christophe, merci pour ta gentillesse et surtout ta patience lors des coupes de tumeurs, immunofluorescence et surtout démasquage (désolé pour tous les bacs en verre qui ont périés durant mes expériences...). Fabrice et Amandine, je n'ai pas eu l'occasion de travailler souvent avec vous mais j'ai pu apprécier votre gentillesse et votre joie de vivre à toute épreuve.

Ces années de thèse ont également été l'occasion de belles rencontres amicales. Tout d'abord la team FJC : Adam, Geoffrey, Alex, merci pour tous ces bons moments passés ensemble grâce à l'organisation du FJC. Je vous souhaite plein de réussite dans votre vie professionnelle comme personnelle.

J'aimerais également remercier les stagiaires de Master 2 maintenant devenu thésard : Omy, Thierry, Jérôme avec qui j'ai pu partager de bons moments aux cours de ma thèse mais aussi parfois en dehors. Je vous souhaite une bonne thèse !! Leïla, dernière thésarde arrivée au laboratoire, je n'ai pas été très présente pour toi lors de tes premiers mois de thèse, j'espère quand même avoir pu t'aider un petit peu. Nous avons partagé des rires et des pleurs...Je te souhaite une bonne thèse pleine d'expériences réussies et d'articles !!

J'aimerais aussi remercier Nicolas, ancien thésard de l'EA3922, merci de m'avoir accompagné lors de mon stage de Master 2 et lors de mes débuts de thèse. Merci de m'avoir appris toutes les techniques que je connais aujourd'hui, merci également d'avoir été un soutien (mon tonton Nico !) lorsque le moral était au plus bas. Tu es quelqu'un de passionné et plein d'humour (je suis bon public !). Tu mérites de faire de grandes choses, je te souhaite plein de réussite dans ta vie professionnelle et dans ta vie personnelle.

De manière beaucoup plus importante, mes deux dernières années de thèse ont été marquées par des « coups de foudre amicaux » conduisant à de très belles amitiés : Clémence, Sandrine, Aurore. Qui aurais cru que nous nous aimerions autant ? Nous étions toutes tellement

différentes à première vue et pourtant tellement complémentaires. Il n'y a pour moi pas assez de mots pour décrire ces deux années, tellement riche en événements et moments passés ensemble qu'elles m'en ont paru dix. Merci d'être mes amies, merci pour tous ces fous rires à se faire mal au ventre que nous avons partagé, tous ces repas partagés « juste » pour être ensemble, tous ces moments de complicité pendant la thèse mais également (surtout ?) en dehors de la thèse. Merci car sans vous, ces deux années de thèse auraient été beaucoup plus triste et insurmontable. Merci également aux conjoints, Christophe et Francis qui ont partagé (de force ?) avec nous tous ces moments... Nous avons partagé nos joies, nos peines, nos réussites et nos échecs. J'emporte avec moi tous nos post-it et petit mots (d'amour !) pour affronter le post doc sans vous à mes côtés. Promettez-moi que l'on se retrouvera vite de l'autre côté de l'Atlantique... ??? Vous allez me manquer...

Mes bidiboules... merci aussi à vous, merci pour tous ces bons moments passés à la fac et tous nos fous rires. Merci de m'avoir poussé à aller aussi loin... moi qui voulait m'arrêter à une licence pro... Merci de m'avoir soutenu pendant ces 3 années de thèse même si je n'ai pas été beaucoup présente. Toutes nos retrouvailles m'ont redonné des forces pour continuer. « Les amis sont comme les étoiles, on ne les voit pas toujours mais on sait qu'ils sont là ». Je serais toujours là, vous allez me manquer...

J'aimerais également remercier ma famille. Papa, maman, Johan et Joël, merci de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse et dans chacun des projets que j'ai pu entreprendre. Merci d'avoir cru en moi, je n'en serais jamais arrivé là sans vous, je vous aime. Merci également à ma belle-famille qui m'a soutenu pendant ma thèse.

Enfin un très très grand merci à mon mari... Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant cette thèse même si ça n'a pas toujours été facile. Merci de m'avoir accompagné au laboratoire les week-end et les vacances, d'avoir supporté mes sautes d'humeur quand les résultats n'étaient pas au beau fixe... Merci d'avoir été là dans mes réussites mais aussi mes échecs et d'avoir toujours cru en moi. Merci pour tous ce que tu fais chaque jour. Et maintenant le post doc aux Etats-Unis, une nouvelle aventure s'offre à nouveau à nous... Merci de me soutenir à nouveau dans ce projet !

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
ABREVIATIONS ET ACRONYMES	9
CADRE ET BUT DU TRAVAIL	15
INTRODUCTION.....	21
I. Autophagie	23
1. Définition.....	23
2. Mécanismes de l'autophagie	25
3. Autophagie sélective.....	38
4. Autophagie et fonctions biologiques	42
5. Autophagie et pathologies	47
II. Autophagie et cancer.....	48
1. Historique	48
2. Autophagie et tumorigenèse	49
3. Autophagie et progression tumorale.....	53
4. Membres de la famille ATG8 et cancer.....	57
5. Autophagie dans les thérapies anti-cancéreuses	59
MATERIELS ET METHODES	65
I. Culture cellulaire.....	67
1. Lignées cellulaires utilisées	67
2. Entretien des cellules	69
3. Congélation et décongélation	70
4. Transfection cellulaire	70
5. Traitement chimique des cellules	71
II. Analyse des protéines	73
1. Extraction des protéines.....	73
2. Western blotting et révélation.....	74
3. Marquage des cellules et microscopie confocale.....	75
4. Cytométrie en flux	76
III. Analyse des ARN totaux	77
1. Extraction des ARN totaux.....	77

2. Transcription inverse (RT)	77
3. Analyse par RT-PCR semi-quantitative	77
4. Analyse par RT-PCR en temps réel.....	78
IV. Etude des phénotypes cancéreux <i>in vitro</i>.....	79
1. Test de prolifération cellulaire : Test MTT	79
2. Test de prolifération clonale	79
3. Test d'invasion cellulaire en chambre de Boyden modifié	80
4. Test de migration cellulaire	81
5. Test d'adhérence cellulaire	81
6. Zymographie.....	82
V. Xénogreffes	82
1. Xénogreffe des lignées MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1 et shQSOX1-2	82
2. Xénogreffe des lignées MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 et GL1 G116A c2	83
3. Immunofluorescence sur coupe de tumeurs	83
RESULTATS.....	85
I. Etude du rôle de la protéine QSOX1 dans l'autophagie des cellules de cancer du sein	87
1. QSOX1 (Quiescine sulfhydryl oxydase 1) : Gène et protéine.....	87
2. Fonctions de QSOX1	88
Publication I:.....	93
II. Etude du rôle de la protéine GABARAP1 dans l'autophagie et le cancer du sein .	109
.....	
Publication II:.....	113
Publication III:	133
III. Rôle des membres de la famille GABARAP dans la transformation cellulaire par H-RasG12V	179
1. Effet de l'inactivation de GABARAP au cours de la transformation	180
2. Mise en place de modèles cellulaires de surexpression de GABARAP1 et GABARAP1 G116A	185
3. Etude des marqueurs de l'autophagie au cours de l'immortalisation et de la transformation cellulaire par HRAS ^{G12V}	187

IV. Etude du protéome global des lignées surexprimant GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A.....	188
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	193
I. Autophagie, stress cellulaire et cancer	195
II. Protéines ATG8 et autophagie	199
III. Protéines ATG8, autophagie et cancer	201
IV. Métabolisme, autophagie sélective et cancer	203
V. Protéine ATG8, autophagie et tumorigenese	205
VI. Perspectives à long terme	207
BIBLIOGRAPHIE	209
ANNEXES.....	247
Revue : “Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy”	249
Liste des communications orales	261
Liste des communications affichées	263
POSTER N°1.....	265
POSTER N°2.....	269
POSTER N°3.....	273
POSTER N°4.....	277

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

3-MA: 3-méthyladénine	DVL2: dishevelled 2
ADN: acide désoxyribonucléique	E2: estradiol-17 β
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire	ECL: enhanced chemiluminescent
ALFY: autophagy linked FYVE protein	EBSS: earl's balanced salt solution
AMBRA1: activating molecule in beclin1-regulated autophagy 1	EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique
AMPK: adenosine monophosphate associated protein kinase	EGFR : epidermal growth factor receptor
ATF4: activating transcription factor 4	eIF2α: eukaryotic initiation factor-2 α
ATF6: activating transcription factor 6	ERK: extracellular signal-regulated kinase
ATG: autophagy related	ERO: espèces réactives d'oxygène
ARN: acide ribonucléique	ESCRT III: endosomal sorting complex required for transport
AT1: angiotensine de type 1	FAD: flavine adénine dinucléotide
BafA1: bafilomycine A1	FIP200: focal adhesion kinase (fak) family interacting protein of 200 kDa
BCL-2: B cell lymphomas 2	FOXO: forkhead box transcription factor of the O class
BET: bromure d'éthidium	GABAA: γ -aminobutyric acid type A
BIF-1: Bax-interacting factor-1	GABARAP: GABAA receptor-associated protein
BNIP3: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3	GABARAPL1: GABARAP like 1
BNIP3L: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like	GABARAPL2: GABARAP like 2
BSA: bovine serum albumin	GATE16: Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa
C12orf44: chromosome 12 open reading frame 44	GEC1: glandular epithelial cell 1
CaMKKβ: calcium/calmodulin kinase kinase β	GFP: green fluorescent protein
CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenyl Hydrazine	HDAC6: histone deacetylase 6
CHOP: C/EBP homologous protein	HER2: human epidermal growth factor receptor 2
CLEAR: coordinated lysosomal expression and regulation	HIF1α: hypoxia-inducible factor 1 α
CMA: chaperon mediated autophagy	HMGB1: high-mobility group box 1
CQ: chloroquine	HRP: horseradish peroxidase
DAPK: death-associated protein kinase	HRS: hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
DMEM: dulbecco's modified eagle's medium	HSC-70: Heat shock cognate 70
DMSO: diméthyl sulfoxyde	HSP: heat shock protein
dNTP: désoxyribonucléoside triphosphate	IL: interleukine
DTT: dithiothréitol	IRE1: inositol requiring enzyme 1

JNK: jun n-terminal kinase	PARKIN: parkinsonien protein 2
Kb: kilobase	PARL: presenilin-associated rhomboid-like protease
kDa: kiloDalton	PAS: phagophore assembly site
KEAP1: kelch-like ECH-associated protein 1	PBS: phosphate buffered saline
KOR: κ opioïde receptor	PCR: polymerase chain reaction
LAMP-1/2: lysosomal-associated membrane protein-1/2	PDI: protein disulfide isomerase
LC3: light chain 3	PE: phosphatidyléthanolamine
LIR: LC3-interacting domain	PERK: double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
LKB1: liver kinase B1	PFA: paraformaldéhyde
MAP: microtubule-associated protein	pH: potentiel d'hydrogène
MAPK: mitogen-activated protein kinase	PI3KC3: phosphatidylinositol 3 kinase de classe III
MCF-7: michigan cancer foundation-7	PI4KIIα: phosphatidylinositol 4-kinaseII α
MDA-MB-231: M.D Anderson-metastatic breast-231	PI3P: phosphatidyl-inositol-3-phosphate
MEF: mouse embryonic fibroblast	PI4P: phosphatidylinositol 4-phosphate
MLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8	PINK1: PTEN-induced putative kinase 1
MMP: matrix metalloproteinase	PKA: protein kinase A
mTOR: mammalian target of rapamycin	PKB: protein kinase B
mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1	PKC: protein kinase C
MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide	PLEKHM1: pleckstrin homology domain containing protein family member 1
MYC: myelocytomatosis oncogene	PMPCB: mitochondrial-processing peptidase
NAC: N-acétyl cystéine	PMSF: phénylméthylsulfonidefluoride
NBR1: neighbour of BRCA1	PTEN: phosphatase and tensin homologue
NF-κB: nuclear factor kappa B	PVDF: polyvinylidène difluoride
NH₄Cl: chlorure d'ammonium	QSCN6: quiescin 6
NIX: <i>Nip-like protein X</i>	QSOX1: quiescine sulfhydryl oxydase
NLRP3: NOD-like receptor family pyrin domain containing 3	RAPTOR: regulatory associated protein of mTOR
NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2	RB1CC1: RB1-inducible coiled-coil 1
NSF: N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein	RE: réticulum endoplasmique
ORF: open reading frame	RHEB: Ras homolog enriched in brain
pb: paire de bases	RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
PPARGC1A: peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid

SDS: Sodium dodécylsulfate	TRAF2: TNF receptor-associated factor 2
SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	Tris: Tri-(hydroxyméthyl) amino methane
shRNA: small hairpin RNA	TSC2: Tuberous sclerosis complex 2
siRNA: small interfering RNA	UBA: ubiquitin associated domain
SIRT1: sirtuine 1	UBL: ubiquitin-like protein
SNARE: soluble NSF attachment protein receptor	ULK1: unc51-like kinase 1
SQSTM1: sequestosome 1	UPR: unfolded protein response
STBD1: starch binding domain-containing protein 1	UTR: untranslated region
SV40: simian virus 40	UVRAG: ultraviolet irradiation resistance associated gene
SVF: sérum de veau foetal	VAMP: vesicle-associated membrane protein
TAK-1: TGF β activated kinase-1	V-ATPases: Vacuolar-type H(+)-ATPases
TBS: tris buffered saline	VDAC1: voltage dependent anion channel 1
TCA: tricarboxylic acid	VPS34: vacuolar protein sorting 34
TEM: transition épithélio-mésenchymateuse	WNT: wingless-integration 1 pathway
TFEB: transcription factor EB	WT: wild type
TNF: tumor necrosis factor	XBP1: X-box binding protein

CADRE ET BUT DU TRAVAIL

Cette thèse, débutée en Octobre 2012, s'inscrit dans les travaux de l'équipe EA3922 et concerne l'étude de l'implication de l'autophagie dans le cancer *via* l'analyse de deux protéines : QSOX1 et GABARAPL1.

Ma première année de thèse a été consacrée à l'étude de la protéine QSOX1 (Quiescin Sulfhydryl Oxydase 1). Le gène *QSOX1* a été identifié au sein de notre laboratoire comme étant régulé négativement par les estrogènes (Pellerin *et al.*, 1993). Il existe deux transcrits majoritaires de *QSOX1* appelés *QSOX1-S* et *QSOX1-L* obtenus par épissage alternatif. Les protéines QSOX1 appartiennent à la famille des sulfhydryls oxydases dépendantes du FAD et oxydent des groupements sulfhydryls en ponts disulfures dans des peptides ou des protéines, favorisant ainsi le repliement correct des protéines et donc leur stabilité (Hoover *et al.*, 1996; Hoover *et al.*, 1999). Il a également été mis en évidence au sein de notre laboratoire que l'expression de la protéine QSOX1-S est induite suite à un stress oxydant (Morel *et al.*, 2007) ou un stress du réticulum endoplasmique (RE) (données non publiées) et protège les cellules contre la mort induite par ces stress. Des études ont également montré un rôle complexe de QSOX1 dans le cancer. En effet, un rôle pro-tumoral de QSOX1 a été mis en évidence dans les cancers de la prostate, du sein et dans les adénocarcinomes pancréatiques (Antwi *et al.*, 2009; Hellebrekers *et al.*, 2007; Katchman *et al.*, 2011; Katchman *et al.*, 2013; Soloviev *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2009). Au contraire, des résultats de notre laboratoire ont mis en évidence un rôle anti-tumoral de QSOX1-S dans les cancers du sein (Pernodet *et al.*, 2012). D'autres études ont également montré un rôle similaire pour QSOX1 dans le cancer du poumon et les tumeurs endothéliales (Gottschling *et al.*, 2013; Hellebrekers *et al.*, 2007). Au vu de ces différentes études, le rôle exact de QSOX1 dans le cancer semble complexe en particulier en raison de l'existence de ses différents transcrits, qui présentent des profils d'expression différents en fonction du type de cancer.

Une recherche systématique des acteurs impliqués dans la régulation de l'autophagie, réalisée sur plus de 20000 gènes, a également suggéré que QSOX1 pourrait inhiber l'autophagie dans des cellules de neuroblastomes H4 (Lipinski *et al.*, 2010a). Etant donné le rôle de QSOX1 dans le stress et le cancer, deux mécanismes étroitement liés à l'autophagie, nous avons donc décidé d'étudier :

- **La régulation de l'expression de QSOX1-S suite à l'induction de l'autophagie**
- **Le rôle de QSOX1-S dans l'autophagie**
- **L'implication de l'autophagie dans les fonctions de QSOX1-S liées aux cellules cancéreuses**

Suite à une réorientation thématique au sein de notre laboratoire, l'étude du gène *QSOX1* a été abandonnée afin de centrer uniquement nos recherches sur la protéine GABARAPL1. La

suite de ma thèse a donc été consacrée à l'étude de cette dernière. Le gène *GEC1/GABARAPL1* (Glandular epithelial cell 1/GABA_A receptor-associated protein like 1) a été identifié au sein de notre laboratoire comme étant régulé positivement par les estrogènes (Pellerin *et al.*, 1993; Vernier-Magnin *et al.*, 2001). La protéine GABARAPL1 a d'abord été impliquée dans le transport intracellulaire des protéines par son interaction avec la tubuline et le récepteur GABA_A (Mansuy *et al.*, 2004). Cette protéine appartient à la famille ATG8 et sous-famille GABARAP (GABA_A Receptor-Associated Protein) qui est beaucoup moins étudiée que la sous-famille LC3. L'ensemble des membres de la famille ATG8 possède un résidu glycine en position 116 essentiel lors du processus d'autophagie (Le Grand *et al.*, 2011a). Il a été mis en évidence au laboratoire que GABARAPL1 est clivée en aval de son résidu glycine puis conjuguée à un phospholipide au niveau des autophagosomes (Chakrama *et al.*, 2010). De plus, il a été mis en évidence que les protéines de la famille GABARAP interviendraient plus particulièrement dans les étapes tardives de la maturation des autophagosomes (Weidberg *et al.*, 2010). La protéine GABARAPL1 possède également un rôle suppresseur de tumeur. En effet, il a été mis en évidence au laboratoire qu'une perte de l'expression du messenger *GABARAPL1* peut être observée dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus sains (Nemos *et al.*, 2003). De plus, une forte expression de *GABARAPL1* est associée à un facteur de bon pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein et la protéine GABARAPL1 inhibe la prolifération des cellules de cancer du sein *in vitro* (Berthier *et al.*, 2010). Zhang et collaborateurs ont également montré que la surexpression de GABARAPL1 dans des cellules MCF-7 inhibe la formation des tumeurs après injection à des souris *nude*, suggérant un rôle suppresseur de tumeur pour le gène *GABARAPL1* (Zhang *et al.*, 2011). Cette étude a également suggéré que GABARAPL1 pourrait agir en tant que suppresseur de tumeur en permettant la dégradation par autophagie sélective de DVL2, acteur moléculaire de la voie WNT (wingless-integration 1 pathway).

Au vu du rôle de GABARAPL1 dans le cancer et l'autophagie, nous avons décidé d'étudier :

- **L'implication du métabolisme cellulaire et de la mitophagie dans les fonctions de GABARAPL1 liées aux cellules cancéreuses**
- **Le rôle de GABARAPL1 lors des étapes précoces et tardives de l'autophagie**
- **L'implication de l'autophagie dans les fonctions de GABARAPL1 liées aux cellules cancéreuses**
- **Le rôle de GABARAP/GABARAPL1 dans la tumorigenèse induite par l'oncogène H-RAS^{G12V}**

L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet de 3 publications dont une actuellement en révision dans le journal *Autophagy*. Par ailleurs, j'ai participé activement à l'écriture d'une revue traitant de l'implication de l'autophagie et des stress oxydants lors des différentes étapes du développement tumoral.

- 1) **Poillet L.**, Pernodet N., Boyer-Guittaut M., Adami P., Borg C., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Despouy G. QSOX1 inhibits autophagic flux in breast cancer cells. (2014). *Plos One*. 9: e86641
- 2) Boyer-Guittaut M., **Poillet L.**, Liang Q., Bôle-Richard E., Ouyang X., Benavides G.A., Chakrama F.Z., Despouy G., Fraichard A., Darley-Usmar V.M., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Zhang J. The role of GABARAPL1 (GEC1) in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. (2014). *Autophagy*. 10: 986-1003
- 3) **Poillet-Perez L.**, Despouy G., Boyer-Guittaut M. and Delage-Mourroux R. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells from tumor initiation to cancer therapy. (2014). *Redox biology*. 4: 184-192
- 4) **Poillet-Perez L.**, Gauthier T., Hervouet E., Fraichard A., Borg C., Pallandre J.R., Gonzales B., Ramdani Y., Boyer-Guittaut M., Delage-Mourroux.R., Despouy G., Despouy G. GABARAPL1 mediated-tumor suppressive functions are independent of its conjugation to autophagosomes. En révision dans le journal *Autophagy*

INTRODUCTION

I. AUTOPHAGIE

1. Définition

1.1. Définition générale

L'autophagie, vient du grec « *auto* » et « *phagein* » qui signifie se manger soi-même et permet la dégradation des complexes de protéines à longue durée de vie et des organelles endommagées. Il existe également un autre système de dégradation appelé le protéasome qui permet, quant à lui, l'élimination des protéines à courte durée de vie ou mal repliées. Le terme « autophagie » a été introduit en 1963 par Christian De Duve suite à l'observation au microscope électronique de vésicules simple membrane contenant du cytoplasme et des organelles telles que des mitochondries ou du RE (Ashford & Porter, 1962; Clark, 1957; De Duve *et al.*, 1955; De Duve & Wattiaux, 1966; Novikoff, 1959).

L'autophagie est un processus catabolique au cours duquel des protéines cellulaires, des organites et des constituants cytoplasmiques endommagés sont dégradés et recyclés au sein du lysosome permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire (Tanida, 2011; Yang & Klionsky, 2010). Ainsi, des dysfonctionnements de l'autophagie sont associés à de nombreuses pathologies humaines telles que les maladies neurodégénératives, le diabète, le vieillissement ou encore le cancer (Wirawan *et al.*, 2012).

1.2. Différents types d'autophagie

Il existe trois types d'autophagie appelés macroautophagie, microautophagie et autophagie dépendante des chaperonnes (chaperone-mediated autophagy, CMA). Ces trois types d'autophagie aboutissent à la dégradation de constituants cytoplasmiques par le lysosome mais présentent des mécanismes d'action différents (Cuervo, 2004) (**Figure 1**).

La macroautophagie (que nous étudierons plus particulièrement dans la suite de ce manuscrit et que nous appellerons « autophagie ») est la forme principale des différents processus d'autophagie et est caractérisée par la formation d'une vacuole d'autophagie ou autophagosome qui va fusionner avec le lysosome afin de dégrader les protéines et organelles endommagées (Xie & Klionsky, 2007) (**Figure 1A**).

Au contraire, la CMA et la microautophagie ne requièrent pas la formation de vacuole d'autophagie et permettent la dégradation directe des constituants cytoplasmiques par le lysosome. La CMA permet une dégradation uniquement sélective des protéines endommagées

ou anormales possédant un motif « KFERQ » dans leur séquence en acides aminés (Dice, 1990) (**Figure 1B**). La CMA est un processus multi-étapes caractérisé par la reconnaissance de la protéine, son ciblage aux lysosomes, sa translocation et sa dégradation au sein du lumen lysosomal. Ce mécanisme requiert la reconnaissance des protéines à dégrader par la protéine chaperonne HSC-70 (Heat shock cognate 70) (Chiang *et al.*, 1989). Cette protéine chaperonne emmène ensuite la protéine à dégrader aux lysosomes et permet son interaction avec LAMP2 (lysosomal-associated protein 2) (Cuervo & Dice, 1996). Ce complexe est ensuite transloqué au sein du lysosome pour permettre la dégradation de la protéine (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

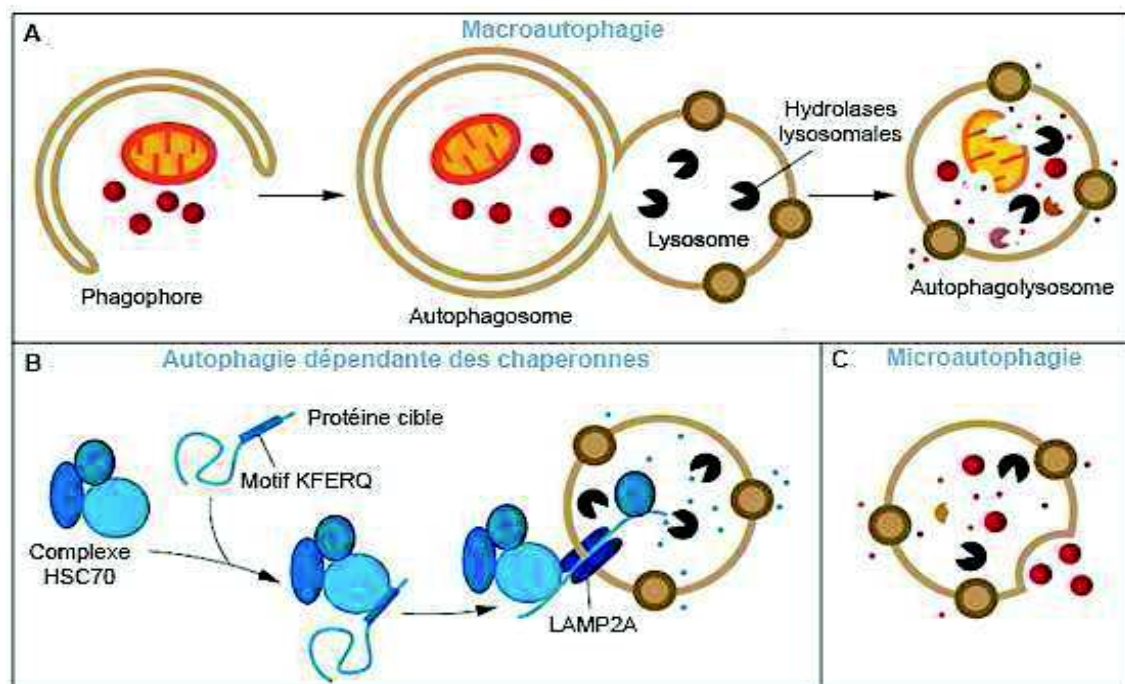


Figure 1 : Représentation des trois types d'autophagie. (A) La macroautophagie est caractérisée par la séquestration du contenu cytoplasmique dans des vésicules d'autophagie appelées autophagosomes. Cet autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome pour permettre la dégradation de son contenu par les hydrolases lysosomales. (B) L'autophagie dépendante des chaperonnes est caractérisée par la dégradation sélective des protéines présentant le motif KFERQ. Ces protéines sont reconnues par la protéine chaperonne HSC70 qui s'associera ensuite à la protéine lysosomale LAMP2 conduisant à la translocation des protéines au sein du lysosome et à leur dégradation. (C) La microautophagie est caractérisée par l'invagination directe du contenu à dégrader par le lysosome. Modifiée d'après (Parzych & Klionsky, 2014)

La microautophagie, quant à elle, est caractérisée par la séquestration d'une partie du cytoplasme directement par le lysosome chez les mammifères (Li *et al.*, 2012) (**Figure 1C**). La microautophagie peut permettre une dégradation non sélective (dégradation aléatoire de portions du cytoplasme) ou sélective en ciblant des organelles particuliers comme des mitochondries (micromitophagie) ou des noyaux (micronucléophagie) (Farre *et al.*, 2009; Kunz *et al.*, 2004). Pour la dégradation de constituants cytosoliques et de petites particules, la membrane du lysosome forme une invagination tubulaire appelée « tube autophagique » tandis qu'il y a formation de protrusions qui permettront l'encerclement des cibles à dégrader dans le

cas de larges structures ou d'organelles (Muller *et al.*, 2000; Todde *et al.*, 2009; Uttenweiler & Mayer, 2008).

2. Mécanismes de l'autophagie

2.1. Mécanisme cellulaire

L'autophagie est un processus multi-étapes qui commence par une étape d'initiation/nucléation consistant en l'induction d'une structure multi-membranaires appelée phagophore (**Figure 2, étapes ① et ②**). L'origine de la membrane de ce phagophore reste encore soumise à débat mais de nombreuses études suggèrent que la membrane plasmique, le RE, l'appareil de Golgi, les endosomes recyclés ou encore les mitochondries pourraient être une source de membrane (Shibutani & Yoshimori, 2014). Lors de l'étape d'élongation, ce phagophore va s'allonger pour séquestrer le contenu cytoplasmique et former une vacuole d'autophagie appelée autophagosome (**Figure 2, étape ③**). Cet autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome pour former un autophagolysosome lors de l'étape de maturation (**Figure 2, étape ④**). L'autophagie se termine par une étape de dégradation du contenu séquestré par les enzymes lysosomales, puis par le recyclage de ce contenu pour la synthèse de macromolécules et la production d'énergie dans la cellule (**Figure 2, étape ⑤**).

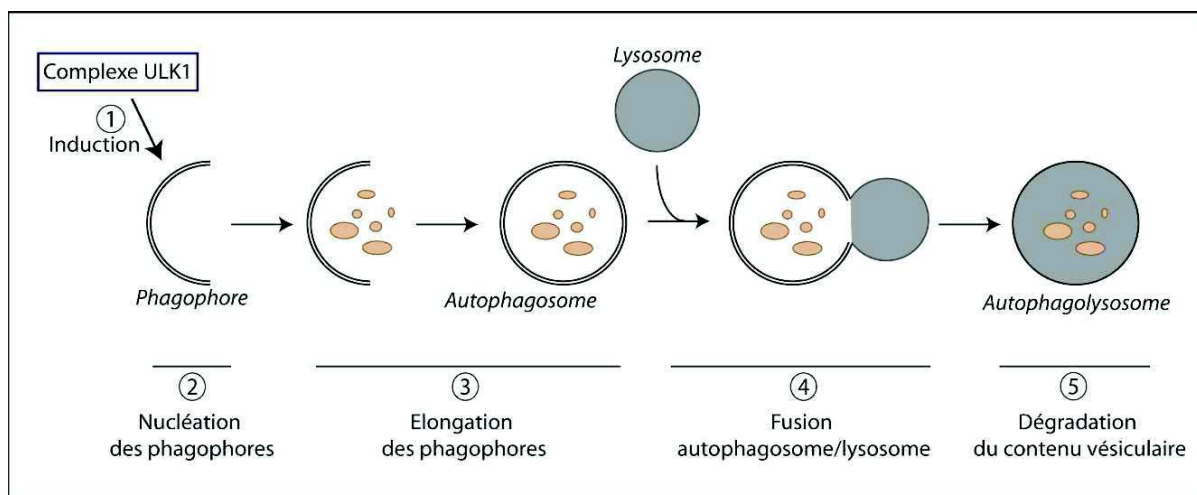


Figure 2 : Différentes étapes de l'autophagie. L'autophagie est un processus multi-étapes qui va être induit suite à l'activation du complexe ULK1 ①. Il y a ensuite formation d'une structure multi-membranaires appelée phagophore ② qui va s'allonger pour séquestrer le contenu cytoplasmique et former une vacuole d'autophagie ou autophagosome ③. Cet autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome pour former l'autophagolysosome ④ dont le contenu sera dégradé et recyclé ⑤.

L'autophagie est un mécanisme conservé de la levure aux mammifères et requiert l'intervention de plus de 30 protéines appelées ATG (AuTophagy related) (Klionsky *et al.*, 2003; Klionsky & Emr, 2000). Ces protéines ont d'abord été découvertes chez la levure mais

possèdent pour la plupart leurs homologues chez les mammifères. Les principales protéines pouvant agir seules ou en complexe au niveau des différentes étapes de l'autophagie chez les mammifères sont : le complexe ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1), la protéine ATG9A, le complexe PI3KC3 (PI3 kinase de classe III), le système de conjugaison ATG12-ATG15 et le système de conjugaison ATG8/MAP1-LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) communément appelé ATG8/LC3 (Parzych & Klionsky, 2014).

La protéine ATG9A est la seule protéine transmembranaire ATG et est localisée à la membrane de nombreux compartiments tels que l'appareil de Golgi et les endosomes chez les mammifères (Young *et al.*, 2006). La protéine ATG9A est également localisée de façon transitoire au niveau des autophagosomes suggérant un rôle de cette protéine dans l'apport de membrane pour la biogenèse des autophagosomes (Orsi *et al.*, 2012).

Le complexe PI3KC3 est nécessaire à la formation des autophagosomes en permettant la synthèse de PI3P (Phosphatidylinositol-3-phosphate) (Funderburk *et al.*, 2010). En effet, l'accumulation de PI3P génère une plateforme qui permet le recrutement des protéines effectrices de l'autophagie, nécessaires à la poursuite de ce processus (Axe *et al.*, 2008; Polson *et al.*, 2010). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux 3 autres complexes, davantage en lien avec mon travail de thèse : ULK1, ATG12-ATG15 et ATG8/LC3 chez les mammifères.

2.2. Initiation de l'autophagie : Complexe ULK1

Le complexe ULK1 comprend différentes protéines : ULK1, ATG13, FIP200/RB1CC1 (FAK-family interacting protein of 200 kDa/RB1-inducible coiled-coil 1) et ATG101/C12orf44 (chromosome 12 open reading frame 44) (Hara *et al.*, 2008; Hosokawa *et al.*, 2009a; Hosokawa *et al.*, 2009b; Mercer *et al.*, 2009). ULK1 interagit avec ATG13 qui se lie directement à FIP200. Cette interaction se fait de manière indépendante de l'état de phosphorylation de ces protéines et du statut en nutriments (Hara *et al.*, 2008; Hosokawa *et al.*, 2009a; Jung *et al.*, 2009). FIP200 et ATG101 sont importantes pour la stabilité et la phosphorylation de ULK1 et ATG13 (Hosokawa *et al.*, 2009b; Mercer *et al.*, 2009) (**Figure 3**).

Lors de l'autophagie, l'activation du complexe ULK1 peut être régulée par phosphorylation de manière dépendante du statut énergétique et du statut en nutriments. Cette régulation est coordonnée par deux principales kinases : mTOR (mammalian target of rapamycin) et AMPK (AMP-activated protein kinase). En effet, lors de conditions riches en nutriments, le complexe mTORC1 (mTOR complex 1), composé de mTOR, RAPTOR (regulatory-associated protein of

mTOR) et MLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), est associé au complexe ULK1 et phosphoryle ULK1 et ATG13 conduisant à leur inactivation. Lors d'une carence en nutriments, mTORC1 est dissocié de ce complexe et ne peut donc plus phosphoryler les protéines ULK1 et ATG13. ULK1 peut alors s'autophosphoryler et phosphoryler ATG13 et FIP200 rendant ainsi le complexe ULK1 actif (Ganley *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2009a; Jung *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010a) (**Figure 3**). AMPK peut également induire l'autophagie en inhibant mTOR de plusieurs façons : i) de manière indirecte en phosphorylant TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) conduisant à l'inactivation de RHEB (Ras homolog enriched in brain) ou ii) en phosphorylant RAPTOR ou iii) de manière directe en phosphorylant mTOR conduisant ainsi à l'activation du complexe ULK1 (Gwinn *et al.*, 2008; Inoki *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011a). Plus récemment, il a été mis en évidence qu'AMPK peut directement interagir avec ULK1 et phosphoryler cette protéine à différents sites de phosphorylation tels que la Ser317, Ser555, Ser777, Ser467 afin de l'activer (Dorsey *et al.*, 2009; Egan *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2010a; Mack *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2011) (**Figure 3**). Néanmoins, l'effet de la phosphorylation d'ULK1 par AMPK sur certains sites de phosphorylation comme la Ser637 reste encore à élucider au vu de résultats contradictoires dans lesquels cette phosphorylation conduit à une stimulation ou une inhibition de l'autophagie (Egan *et al.*, 2011b; Shang *et al.*, 2011). De plus, mTOR peut phosphoryler ULK1 au niveau de sa Ser757 afin d'empêcher l'interaction AMPK-ULK1 et réguler négativement l'induction de l'autophagie (Kim *et al.*, 2011a; Shang *et al.*, 2011).

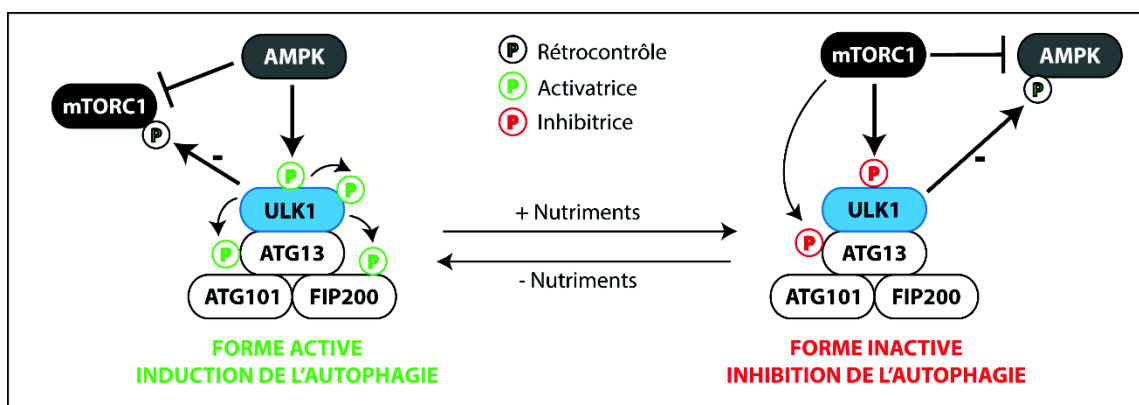


Figure 3 : Régulation du complexe ULK1 par AMPK et mTORC1. La phosphorylation de la protéine ULK1 par mTORC1 au niveau de la Ser757 conduit à une forme inactive du complexe ULK1 et donc à l'inhibition de l'autophagie. Au contraire, lors d'une carence en nutriments ou en énergie, la phosphorylation de la protéine ULK1 par AMPK au niveau des Ser317, Ser555, Ser777 ou Ser467 conduit à une forme active du complexe et à l'induction de l'autophagie. De plus, ULK1 peut inhiber les protéines mTOR et AMPK conduisant respectivement à un rétrocontrôle positif ou négatif de l'autophagie.

Des études ont également mis en évidence une inhibition d'AMPK et mTOR par ULK1 permettant ainsi une régulation de l'autophagie. En effet, lors de l'induction de l'autophagie,

ULK1 peut phosphoryler RAPTOR permettant ainsi le maintien de l'inhibition de mTORC1 lorsque l'apport en nutriments reste limité (Dunlop *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011). Au contraire, ULK1 peut phosphoryler AMPK conduisant à son inactivation et permettant ainsi un rétrocontrôle négatif de l'autophagie (Loffler *et al.*, 2011).

La forme active du complexe ULK1 conduit à l'induction de l'autophagie et participe à la formation des autophagosomes en favorisant l'activité du complexe PI3KC3 qui comprend BECLINE 1, ATG14L, VPS34 (vacuolar protein sorting 34) et p150. En effet, ULK1 peut phosphoryler AMBRA1 (activating molecule in beclin1-regulated autophagy 1), une protéine interagissant avec le complexe PI3KC3, permettant la relocalisation de ce complexe au site d'initiation de l'autophagie (Di Bartolomeo *et al.*, 2010). ULK1 peut également phosphoryler BECLINE 1 conduisant à une augmentation de l'activité du complexe PI3KC3 et une augmentation de l'induction de l'autophagie (Russell *et al.*, 2013). La protéine ULK1 régule également la relocalisation d'ATG9, une protéine régulant la biogenèse des autophagosomes, au niveau de ces vésicules lors d'une carence en nutriments (Mack *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces résultats met en évidence que le complexe ULK1 régule l'induction de l'autophagie (**Figure 2 ①**). Ils suggèrent également que ce complexe agit comme une plateforme nécessaire au recrutement des protéines ATG en aval permettant ainsi la nucléation des phagophores, étape suivante du processus autophagique (**Figure 2 ②**).

2.3. Elongation et fermeture des autophagosomes : Système de conjugaison Atg12-Atg5

Suite à l'étape de nucléation, le phagophore va s'allonger pour séquestrer le contenu cytoplasmique endommagé et former une vacuole d'autophagie appelée autophagosome. Cette étape appelée étape d'élongation et fermeture des autophagosomes requiert l'intervention de deux systèmes de conjugaison : ATG12-ATG5 et ATG8/LC3-phospholipides (Ohsumi, 2001; Tanida *et al.*, 2008). Les mécanismes d'action de ces deux systèmes de conjugaison sont similaires à ceux des systèmes d'ubiquitinylation. En effet, lors de l'ubiquitinylation, l'ubiquitine est clivée pour exposer son résidu glycine en position C-terminale puis liée à une enzyme E1 et activée par création d'un pont thioester. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une enzyme E2 et liée au résidu lysyl de sa cible grâce à une enzyme E3 (Weissman, 2001).

Dans le cas du complexe ATG12-ATG5, ATG12 est conjuguée à ATG5 à l'aide de deux autres protéines ATG : ATG7 et ATG10 qui présentent une activité similaire à l'enzyme

activatrice E1 et conjugatrice E2 du système d'ubiquitylation, respectivement. En effet, ATG12, qui possède une glycine en position C-terminale, va être activée par création d'un pont thioester avec ATG7 puis transférée sur ATG10 et conjuguée à ATG5 au niveau de sa Lys149 (Mizushima *et al.*, 1998; Mizushima *et al.*, 2002; Nemoto *et al.*, 2003; Shintani *et al.*, 1999; Tanida *et al.*, 1999). L'interaction entre ATG5 et ATG12 ne nécessite pas l'intervention d'une protéine de type E3. Le complexe ATG12-ATG5 interagit ensuite de manière non covalente avec la protéine ATG16L qui s'oligomérisse pour former un complexe multimérique d'environ 800 kDa (Kuma *et al.*, 2002; Mizushima *et al.*, 2003; Mizushima *et al.*, 1999) (**Figure 4A**). Contrairement à l'ubiquitine qui peut être conjuguée à de multiples cibles, ATG5 semble être la seule cible d'ATG12. De plus, la conjugaison ATG12-ATG5 se fait de manière constitutive et semble irréversible (Mizushima *et al.*, 1998).

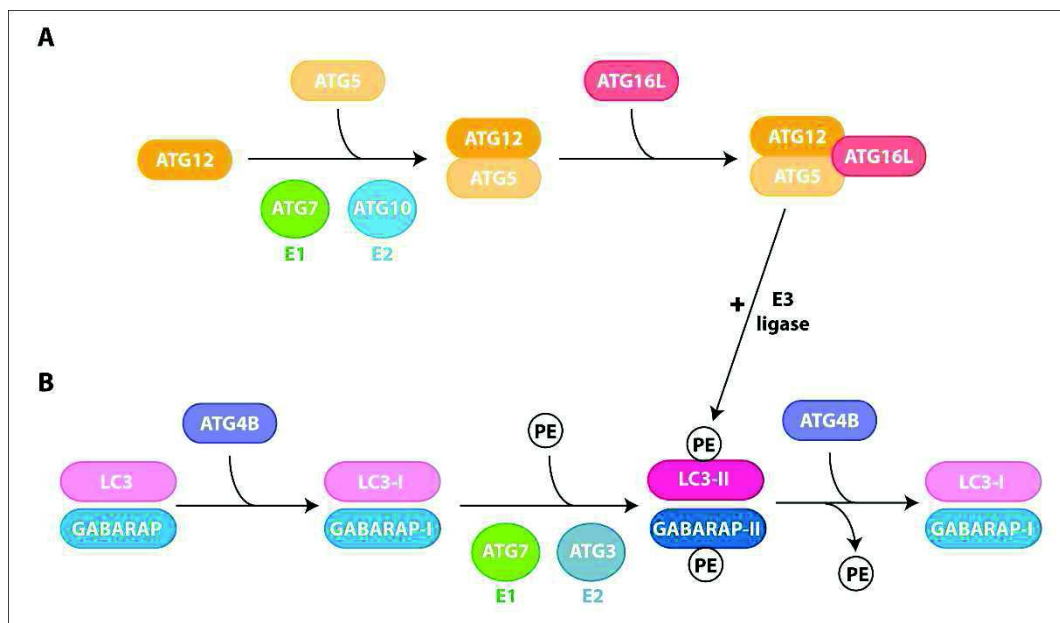


Figure 4 : Système de conjugaison : ATG12-ATG5-ATG16L et LC3-phospholipides. (A) ATG12 est activée par ATG7, transférée sur ATG10 puis conjuguée à ATG5. Le complexe ATG12-ATG5 peut ensuite interagir avec ATG16L. **(B)** Les protéines des sous-familles LC3 et GABARAP sont clivées par la protéase ATG4B pour donner les formes cytosoliques LC3-I et GABARAP-I. LC3-I et GABARAP-I sont ensuite activées par ATG7, transférées sur ATG3 et conjuguées à un phospholipide pour donner les formes membranaires LC3-II et GABARAP-II. La protéase ATG4B peut également délipider LC3-II et GABARAP-II afin de recycler LC3-I et GABARAP-I pour un nouveau processus d'autophagie. D'après (Parzych & Klionsky, 2014)

Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L est localisé au niveau de la membrane du phagophore en expansion, principalement sur la face externe et est dissocié de cette membrane avant ou après la fermeture des autophagosomes (Mizushima *et al.*, 2003; Mizushima *et al.*, 2001). Ce complexe est indispensable à l'autophagie et semble agir de façon indirecte sur l'étape d'élongation du phagophore en régulant le système de conjugaison ATG8/LC3-phospholipides (Geng & Klionsky, 2008; Mizushima *et al.*, 2001). En effet, le complexe

ATG12-ATG5-ATG16L semble permettre le recrutement de LC3 au niveau du phagophore et possède également une activité similaire à l'enzyme E3 facilitant ainsi la conjugaison d'ATG8/LC3 aux phospholipides (Fujita *et al.*, 2008b; Hanada *et al.*, 2007).

2.4. Elongation et fermeture des autophagosomes : Système de conjugaison ATG8/LC3

Les protéines de la famille ATG8

Chez les mammifères, il existe plusieurs homologues d'ATG8 classés en 2 sous-familles : la sous-famille LC3 contenant LC3A, LC3B et LC3C et la sous-famille GABARAP (GABA_A receptor-associated protein) contenant GABARAP, GABARAPL1 (GABA_A receptor-associated protein like 1), GATE-16/GABARAPL2 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa/GABA_A receptor-associated protein like 2) et GABARAPL3 (GABA_A receptor-associated protein like 3) (He *et al.*, 2003; Xin *et al.*, 2001).

GABARAPL1	MKFQYKEDHPFEYRKKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLLDKRKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLLDKKYLVPVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLHRCVESA KIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRKYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGKAAVDPADRCKEVQQIRDQHP SKIPV I IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPV I IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFPLPDLKTKFLVPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKKAESER IADRFPKRI PVI CEK-AEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDES VY G K-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPTSATMGQLYQEHH EED FFLYIAYSDES VY G L-117
GABARAPL2	MW IIRKRIQLPSEKAI FLFVD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYS GENTF G F-117
LC3A	VKI IRRRLQLNPTQAFLLVNGHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYMVYASQETF G F-125
LC3B	IKI IRRRLQLNANQAFLLVNGHSMVSVSTPISEVYESEKDEDGFLYMVYASQETF G M K L S V-125
LC3C	LSI IRRMVLRAEAFYLLVNNKSLVMSATMAE IYRDYKDEDGFVYMTYASQETF G C LESAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRI ML PPEKAI FIFVN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFLYVTVS GENTF G R-117

Figure 5 : Alignement des séquences protéiques des différents membres de la famille ATG8. Les séquences des protéines GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3A, LC3B, LC3C chez l'homme et Atg8 chez la levure sont comparées. En rouge sont symbolisés les acides aminés qui diffèrent de la protéine GABARAPL1. En bleu est représentée la glycine en position C-terminale conservée chez l'ensemble des membres de la famille ATG8. Cette glycine est essentielle pour leur rôle dans l'autophagie. D'après Le Grand *et al.*, 2011.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la sous-famille GABARAP et plus particulièrement la protéine GABARAPL1. Le gène *GABARAPL1/GEC1* a été mis en évidence au sein de notre laboratoire comme étant régulé positivement par les estrogènes dans des cellules endothéliales glandulaires d'endomètre de cobaye (Pellerin *et al.*, 1993; Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Le gène *GABARAPL1* humain, localisé sur le chromosome 12, contient 4 exons et 3 introns. La partie codante de *GABARAPL1* humain présente 93% d'identité avec *GABARAPL1* de cobaye

et 79% d'identité de séquence avec *GABARAP*, découvert par Wang et collaborateurs (Wang *et al.*, 1999). Le gène *GABARAPL1* présente également une forte homologie de séquence avec les gènes *GABARAPL2* et *GABARAPL3* (Xin *et al.*, 2001). Cette homologie de séquence est également maintenue au niveau protéique (Le Grand *et al.*, 2011a). En effet, chez l'homme, la protéine GABARAPL1 présente 96% d'identité avec la protéine GABARAPL3, 87% d'identité avec la protéine GABARAP et 61% d'identité avec la protéine GABARAPL2. Cette protéine présente néanmoins un pourcentage plus faible d'identité avec la famille LC3 : 31% d'identité avec la protéine LC3A, 29% d'identité avec la protéine LC3B et 35% d'identité avec la protéine LC3C (**Figure 5**).

Les protéines GABARAPL1 (pdb code : 2R2Q), GABARAP (pdb code : 1GNU) (Knight *et al.*, 2002), GABARAPL2 (pdb code : 1EO6) (Paz *et al.*, 2000) et LC3 (pdb code : 1UGM) (Sugawara *et al.*, 2004) possèdent également de très fortes similarités au niveau de leur structure tridimensionnelle avec deux hélices α à l'extrémité N-terminale, un feuillet β à l'extrémité C-terminale et une structure centrale proche de celle de l'ubiquitine (**Figure 6**). Ces protéines sont ainsi considérées comme des UBL (ubiquitin-like protein) (Coyle *et al.*, 2002).

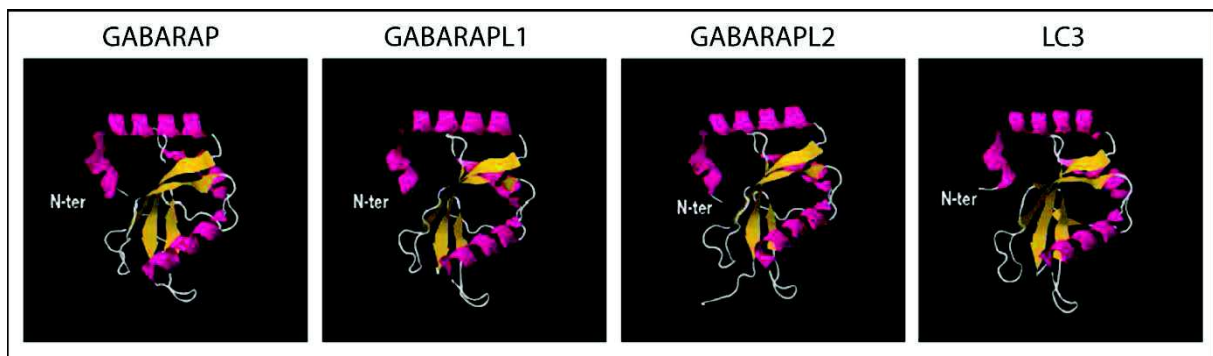


Figure 6 : Structure cristallographique des membres de la famille ATG8. Les structures cristallographiques des protéines ont été obtenues à partir de la banque de données RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Les membres de la sous-famille GABARAP ont d'abord été identifiés comme étant impliqués dans le transport intracellulaire des protéines. En effet, il a été mis en évidence que les protéines GABARAP et GABARAPL1 interagissent avec la tubuline et la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006; Mansuy *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1999). La protéine GABARAPL1 en interagissant avec la tubuline favorise sa polymérisation suggérant également une interaction de GABARAPL1 avec les microtubules (Mansuy *et al.*, 2004). Les protéines GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 interagissent également avec le récepteur aux κ opioïdes et augmentent le nombre de ces récepteurs à la surface des cellules CHO (Chinese hamster ovary cell) (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). De la même manière,

il a été mis en évidence que les protéines GABARAP et GABARAPL1 interagissent avec le récepteur AT1 (Angiotensin receptor type 1) de l'angiotensine II et augmente l'expression de ce récepteur à la surface cellulaire (Cook *et al.*, 2008). La protéine LC3 a également été identifiée au départ comme interagissant avec les microtubules (Mann & Hammarback, 1994).

Fonctions des membres de la famille ATG8 dans l'autophagie

Contrairement au système de conjugaison ATG12-ATG5, LC3 ne se lie pas à une protéine cible mais à un phospholipide : phosphatidyléthanolamine ou phosphatidylsérine (Ichimura *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2000; Sou *et al.*, 2006). Cette liaison à un phospholipide est communément appelée « lipidation ». Parmi les protéines de la famille ATG8 chez les mammifères, LC3B, couramment appelée LC3, est la mieux caractérisée et représente un homologue fonctionnel de la protéine ATG8 chez la levure (Kabeya *et al.*, 2000). Les membres de la famille ATG8 possèdent une glycine C-terminale conservée en position 116 (Sous-famille GABARAP) ou 120 (Sous-famille LC3) essentielle à leur lipidation et à leur rôle dans l'autophagie (Tanida *et al.*, 2004c) (**Figure 5**). En effet, LC3 est synthétisée sous la forme proLC3 puis est clivée par la protéase ATG4B pour exposer sa glycine et donner la forme cytosolique mature appelée LC3-I (Kabeya *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2004b). Durant l'élongation du phagophore, LC3-I est activée par ATG7 (enzyme E1), transférée sur ATG3 (enzyme E2) et finalement conjuguée à un phospholipide pour donner la forme membranaire appelée LC3-II (Kabeya *et al.*, 2004; Sou *et al.*, 2006; Tanida *et al.*, 2002; Tanida *et al.*, 2001) (**Figure 4B**). Cette lipidation permet la localisation de LC3-II au niveau des autophagosomes. Néanmoins, le mécanisme exact par lequel LC3-II est recrutée au niveau des autophagosomes reste à ce jour inconnu. La localisation du complexe ATG12-ATG5 lui permet de réguler la liaison de LC3 aux phospholipides. En effet, le complexe ATG12-ATG5 peut avoir un rôle similaire à l'enzyme E3 pour la conjugaison LC3-phospholipide puisqu'il facilite le transfert de LC3 sur ATG3 et donc l'interaction avec le phospholipide (Fujita *et al.*, 2008b; Hanada *et al.*, 2007; Metlagel *et al.*, 2014; Mizushima *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001). A l'inverse de la conjugaison ATG12-ATG5, la conjugaison LC3-phospholipide est réversible, LC3-II sur la face externe des autophagosomes est délipidée par ATG4B afin de recycler LC3-I pour la formation de nouveaux autophagosomes (Tanida *et al.*, 2004a). La lipidation de LC3-II peut être induite suite à une carence en nutriments ou en présence d'inducteurs de l'autophagie (Kabeya *et al.*, 2000; Mizushima *et al.*, 2004).

Les membres de la famille GABARAP sont également modifiés par ATG4B (mais aussi ATG4A pour GABARAPL2 et ATG4D pour GABARAPL1) avec la participation d'ATG7 et ATG3 comme cela a été démontré pour LC3 (Betin & Lane, 2009; Chakrama *et al.*, 2010; Kabeya *et al.*, 2004; Sou *et al.*, 2006; Tanida *et al.*, 2003; Tanida *et al.*, 2004a). Les formes GABARAP-II, GABARAPL1-II et GABARAPL2-II ainsi obtenues sont également liées aux membranes internes et externes des autophagosomes (**Figure 7**). Comme pour LC3, cette lipidation est réversible et les protéines présentes sur la face externe des autophagosomes peuvent être délipidées par ATG4B et recyclées tandis que celles présentes sur la face interne seront dégradées par les enzymes lysosomales.

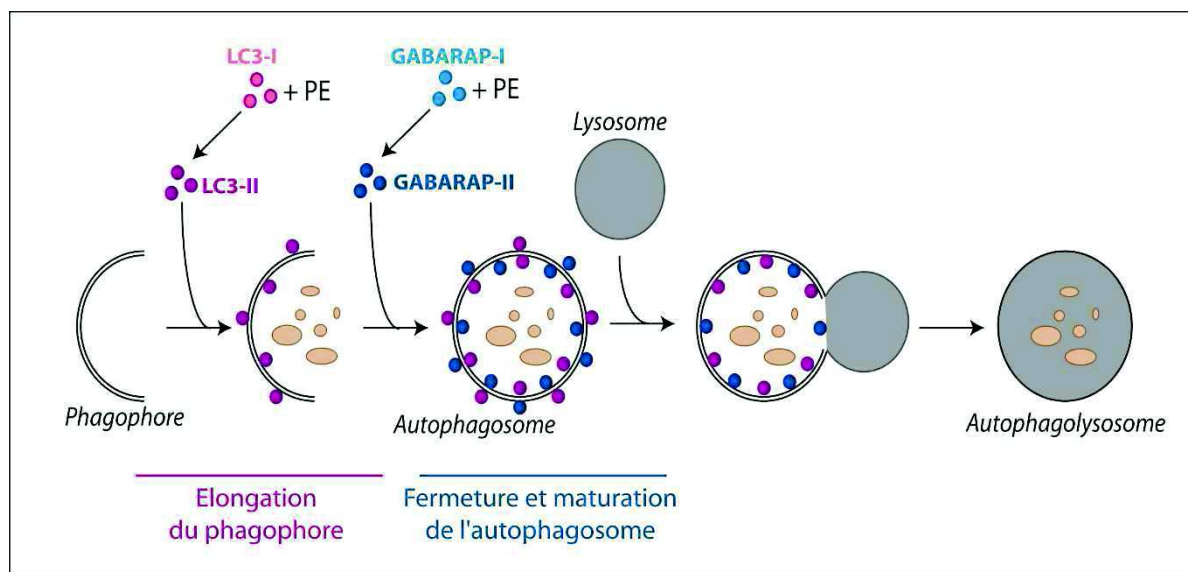


Figure 7 : Rôle des membres de la famille ATG8 dans l'autophagie. Lors de l'induction de l'autophagie, les protéines des sous-familles LC3 et GABARAP sont clivées puis liées à un phospholipide pour donner la forme lipidée LC3-II et GABARAP-II. Sous cette forme, les membres de la sous-famille LC3 participent à l'élongation des phagophores, tandis que les membres de la sous-famille GABARAP participent à la fermeture et à la maturation des autophagosomes.

Les protéines de la famille ATG8 sont impliquées dans l'élongation et la fermeture des autophagosomes (**Figure 7**). En effet, il a été montré que l'extinction d'ATG3 conduit à une perte de LC3-II, une diminution du complexe ATG12-ATG5 et une dissociation d'ATG16L du phagophore chez la souris. Cela conduit également à la production d'autophagosomes plus petits et dont la fermeture n'est pas terminée suggérant un rôle du complexe ATG12-ATG5-ATG16L et de LC3-II dans l'élongation et la fermeture du phagophore (Sou *et al.*, 2008). Ces résultats ont été confirmés par la surexpression d'un mutant inactif d'ATG4B qui conduit à l'inhibition de la lipidation de LC3 et à l'observation d'un grand nombre d'autophagosomes non clos (Fujita *et al.*, 2008a). Un rôle différentiel des membres de la sous-famille LC3 et GABARAP a également été suggéré. En effet, la surexpression de LC3 dans des cellules n'exprimant plus les protéines de la sous-famille GABARAP conduit à une accumulation de

larges vésicules membranaires. Au contraire, la surexpression de GABARAPL2 dans des cellules n'exprimant plus les membres de la sous-famille LC3 ne modifie pas la taille de ces vésicules. De plus, l'inhibition de la lipidation des membres de la sous-famille GABARAP conduit à une accumulation de vésicules autophagiques ouvertes. Ces résultats suggèrent que les membres de la sous-famille LC3 seraient impliqués dans l'élongation du phagophore tandis que les membres de la sous-famille GABARAP seraient plutôt impliqués dans les étapes plus tardives de la maturation des autophagosomes (Weidberg *et al.*, 2010) (**Figure 7**).

Le mécanisme par lequel les membres de la famille ATG8 peuvent participer à l'élongation du phagophore reste encore à élucider. Néanmoins, il a été mis en évidence que, suite à leur conjugaison à un phospholipide, LC3 et GABARAPL2 peuvent favoriser l'adhésion et la fusion de membranes (Weidberg *et al.*, 2011). Cette activité est dépendante de leur extrémité N-terminale et semble requise pour la biogenèse des autophagosomes. Ainsi, il peut être suggéré que les membres de la famille ATG8 pourraient participer à l'élongation du phagophore en permettant l'apport de membranes et la fusion de celles-ci avec le phagophore, deux étapes requises pour l'élongation de cette vésicule. Le mécanisme permettant ensuite la fermeture de ce phagophore reste encore à déterminer.

Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des membres de la famille ATG8

Les membres de la famille ATG8 peuvent également être soumis à des modifications post-traductionnelles autres que la lipidation telles que la phosphorylation ou l'acétylation qui vont permettre la régulation de l'autophagie (Wani *et al.*, 2015). En effet, LC3 peut être phosphorylée par PKA et PKC (protéine kinase A et C) ce qui conduit à une inhibition de sa lipidation et une inhibition de l'autophagie (Cherra *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010a). Au contraire, LC3, GABARAP et GABARAPL1 peuvent être phosphorylées par MAPK5 (mitogen-activated protein kinase 5)/ERK8 (extracellular signal-regulated kinase 8) ce qui empêche la phosphorylation par PKA et conduit à une induction de leur lipidation et une induction de l'autophagie (Colecchia *et al.*, 2012). L'autophagie peut également être régulée par acétylation. En effet, la protéine LC3 peut être acétylée par p300 conduisant à l'inhibition de l'autophagie (Lee & Finkel, 2009). Lors d'une privation sérique, LC3 est désacétylée par HDAC6 (Histone deacetylase 6) ou SIRT1 (Sirtuine 1) dans des modèles de cellules HeLa (Henrietta Lacks) et MEF (Mouse embryonic fibroblast) (Lee *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013c). Plus récemment, une étude a confirmé la désacétylation de LC3 par SIRT1 dans des modèles de cellules HEK293 (Human embryonic kidney 293) (Huang *et al.*, 2015). Cette étude a

également mis en évidence une désacétylation des autres membres de la famille ATG8 : GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 lors d'une privation sérique.

2.5. Biogenèse des lysosomes

Le lysosome a été décrit pour la première fois par Christian De Duve dans les années 1950 (de Duve, 2005). Il représente l'organelle finale de la voie endocytique et permet ainsi la dégradation de matériel extracellulaire par endocytose ou intracellulaire par autophagie (Luzio *et al.*, 2003; Mizushima *et al.*, 2008). Le lysosome est également impliqué dans d'autres processus biologiques tels que la réparation de la membrane plasmique, la réponse immunitaire ou la transduction du signal (Luzio *et al.*, 2007; Mindell, 2012; Saftig & Klumperman, 2009; Settembre *et al.*, 2013). Le lysosome possède un lumen acide (pH 4,6-5) contenant plus de 50 hydrolases solubles telles que les protéases, peptidases, phosphatases, nucléases, glycosydases, sulfatases et lipases permettant ainsi la dégradation de tous les types de macromolécules (Lubke *et al.*, 2009). L'acidité du lysosome est maintenue par sa membrane formée d'une bicouche lipidique et contenant plus de 20 protéines membranaires comme LAMP1 (Lysosome-associated membrane protein 1), LAMP2 (Lysosome-associated membrane protein 2) et les pompes V-ATPases (Vacuolar-type H(+)-ATPases) (Forgac, 2007; Mindell, 2012). Ces pompes sont responsables du maintien du pH acide en conduisant les protons au sein du lysosome grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP (Ohkuma *et al.*, 1982).

Il a récemment été mis en évidence que les fonctions lysosomales peuvent être régulées de manière coordonnée afin de répondre et de s'adapter aux signaux environnementaux grâce à l'expression d'un réseau de gènes appelé CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation). Ce réseau, qui comprend des gènes codant des protéines impliquées dans la biogenèse des lysosomes, dans les fonctions lysosomales et dans l'autophagie, est régulé par le facteur de transcription TFEB (Transcription factor EB) (Sardiello & Ballabio, 2009; Sardiello *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2011). TFEB est régulé négativement par mTOR et ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) et positivement par PKC β (Protein kinase C β) (Ferron *et al.*, 2013; Martina *et al.*, 2012; Settembre *et al.*, 2011; Settembre *et al.*, 2012). Suite à la régulation par ces kinases, TFEB peut réguler positivement l'expression de gènes du réseau CLEAR permettant de réguler l'expression des gènes du lysosome, contrôler le nombre de lysosomes et favoriser la dégradation des substrats lysosomaux mais également réguler l'autophagie conduisant à une augmentation du nombre d'autophagosomes, de la fusion autophagosome/lysosome et de la dégradation de substrats (Ma *et al.*, 2012; Palmieri *et al.*,

2011; Sardiello *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2011).

2.6. Fusion autophagosome/lysosome et dégradation

Après sa fermeture, l'autophagosome mature fusionne avec le lysosome pour donner un autophagolysosome (Mizushima *et al.*, 2011; Yang & Klionsky, 2010) (**Figure 8 ①**). Avant sa fusion avec le lysosome, l'autophagosome mature peut également fusionner avec un endosome pour donner un amphisome (Berg *et al.*, 1998; Fader *et al.*, 2009; Liou *et al.*, 1997; Lucocq & Walker, 1997) (**Figure 8 ②**). Cet amphisome est plus acide que l'autophagosome suite à la fusion avec l'endosome qui possède des pompes à protons et des protéines membranaires lysosomales mais pas d'enzymes lysosomales (Eskelinen, 2005). L'amphisome peut ensuite acquérir les hydrolases en fusionnant avec le lysosome (Dunn, 1990) (**Figure 8 ③**).

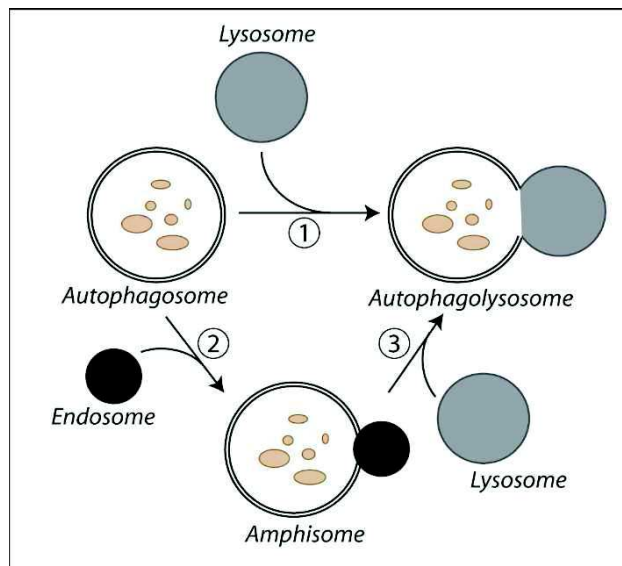


Figure 8 : Fusion autophagosome/lysosome. ① Après sa fermeture, l'autophagosome mature peut fusionner avec un lysosome pour former l'autophagolysosome. ② L'autophagosome peut également fusionner avec un endosome pour former un amphisome. ③ Cette amphisome fusionnera ensuite avec le lysosome pour donner l'autophagolysosome dont le contenu sera dégradé.

Les autophagosomes sont normalement localisés de façon aléatoire dans le cytoplasme tandis que les lysosomes ou endosomes sont situés majoritairement au niveau périnucléaire. Afin de permettre la fusion autophagosome/lysosome, les autophagosomes circulent de façon bidirectionnelle le long des microtubules grâce aux dynéines et kinésines, protéines motrices, permettant ainsi leur localisation à proximité des lysosomes (Kimura *et al.*, 2008; Kochl *et al.*, 2006; Maday *et al.*, 2012; Ravikumar *et al.*, 2005). Il a été mis en évidence que les microtubules ne sont pas indispensables mais facilitent la fusion autophagosome/lysosome chez les mammifères (Fass *et al.*, 2006; Monastyrska *et al.*, 2009). En effet, la déstabilisation des microtubules conduit à un blocage de la maturation des autophagosomes tandis que leur stabilisation augmente ce processus (Aplin *et al.*, 1992; Hoyvik *et al.*, 1991; Jahreiss *et al.*,

2008; Kochl *et al.*, 2006; Webb *et al.*, 2004; Yu & Marzella, 1986).

La fusion autophagosome/lysosome requiert ensuite l'intervention de plusieurs groupes de protéines décrit ci-dessous. Le complexe PI3KC3 n'intervient pas uniquement lors de l'induction de l'autophagie mais peut également moduler positivement ou négativement la maturation des autophagosomes. En effet, la protéine UVRAG (UV irradiation resistance associated gene), interagissant avec BECLIN 1 au sein du complexe PI3KC3, peut interagir avec la protéine VPS de classe C pour réguler positivement la maturation des autophagosomes (Liang *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008).

Par cette interaction, UVRAG peut stimuler l'activation de la GTPase RAB7 impliquée dans la maturation des autophagosomes (Gutierrez *et al.*, 2004; Jager *et al.*, 2004). Au contraire, l'association de la protéine Rubicon au complexe PI3KC3-UVRAG conduit à l'inhibition de la maturation des autophagosomes (Matsunaga *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2009). Le complexe ESCRT III (endosomal sorting complex required for transport) et la protéine HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), impliqués dans la biogenèse et le transport des endosomes, sont également requis pour la fusion des autophagosomes avec les endosomes ou lysosomes (Filimonenko *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Rusten *et al.*, 2007; Tamai *et al.*, 2007). Les protéines VTI1B, VAMP3 (vesicle-associated membrane protein 3), VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7), appartenant aux protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) ainsi que LAMP1 et LAMP2 appartenant aux protéines transmembranaires du lysosome sont également impliquées dans la fusion autophagosome/lysosome puisqu'une délétion de ces protéines conduit à une inhibition de ce processus (Atlashkin *et al.*, 2003; Eskelinen, 2005; Eskelinen *et al.*, 2004; Fader *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2000).

Récemment, il a été mis en évidence que PLEKHM1 (Pleckstrin homology domain containing protein family member 1), une protéine effectrice de RAB7 localisée à la surface du lysosome, peut favoriser la fusion autophagosome/lysosome par son interaction avec l'ensemble des membres de la famille ATG8 *via* son motif LIR (LC3-interacting region) (McEwan & Dikic, 2015; McEwan *et al.*, 2015). Il a également été mis en évidence que les membres de la famille GABARAP régulent la fusion autophagosome/lysosome en interagissant avec la kinase PI4KII α (Phosphatidylinositol 4-kinaseII α) permettant la génération de PI4P (phosphatidylinositol 4-phosphate) au niveau des autophagosomes, une étape critique à la fusion avec les lysosomes (Albanesi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

De manière intéressante, l'autophagolysosome, généré par la fusion entre un lysosome acide (0,1 à 1 μ m) et un autophagosome neutre de plus grande taille (0,5 à 1,5 μ m), semble présenter

un pH encore plus bas que le lysosome, suggérant l'existence de mécanismes permettant le maintien d'un pH acide optimal au sein de l'autophagolysosome (Klionsky *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2004). Il a été suggéré que cette acidification de l'autophagolysosome est réalisée *via* un double mécanisme : i) l'inhibition de mTOR qui conduit à l'activation de TFEB régulant l'expression des gènes du lysosome et ii) la fusion autophagosome/lysosome (Zhou *et al.*, 2013).

Exposé au lumen acide du lysosome et aux hydrolases, la membrane interne de l'autophagosome ainsi que le contenu de cette vésicule sont ensuite dégradés. Les macromolécules produites sont ensuite exportées à l'extérieur de l'autophagolysosome à l'aide de perméases afin d'être utilisées par la cellule pour les processus anaboliques et la production d'énergie (Yang & Klionsky, 2009; Yorimitsu & Klionsky, 2005). Les molécules impliquées dans ce mécanisme restent encore très peu connues. De plus, une fois l'ensemble des produits dégradés, il semble que l'autophagolysosome redevienne un lysosome ayant la possibilité d'être à nouveau utilisé pour l'endocytose ou l'autophagie. Si la dégradation du contenu est incomplète, l'autophagolysosome peut devenir un corps résiduel contenant des matériaux non digérables qui sera éliminé par exocytose (Eskelinen & Saftig, 2009; Yi & Tang, 1999).

3. Autophagie sélective

3.1. Généralités

L'autophagie sélective permet la dégradation d'organelles endommagées ou superflues telles que des agrégats ubiquitinylés, des mitochondries (mitophagie), des peroxysomes (pexophagie) ou des noyaux (nucléophagie) tandis que l'autophagie non sélective est induite pour éliminer des parties aléatoires du cytoplasme suite à une carence en acides aminés par exemple. Ce mécanisme sélectif nécessite l'intervention d'adaptateurs de l'autophagie qui permettent l'interaction entre les substrats à dégrader et les autophagosomes permettant ainsi leur dégradation par autophagie (**Figure 9A**). Par exemple, l'adaptateur p62/SQSTM1 est impliqué dans la dégradation des agrégats ubiquitinylés en se liant à l'ubiquitine grâce à son domaine UBA (ubiquitin associated) et à LC3 localisé aux autophagosomes grâce à son motif LIR (Bjorkoy *et al.*, 2005; Ichimura *et al.*, 2008; Komatsu *et al.*, 2007; Noda *et al.*, 2008; Pankiv *et al.*, 2007; Shvets *et al.*, 2008; Vadlamudi *et al.*, 1996) (**Figure 9B**). p62 a également été identifiée comme interagissant avec LC3A, GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 (Pankiv *et al.*, 2007). Après leur liaison à p62, les protéines ubiquitinylées sont séquestrées par

l'autophagosome *via* les membres de la famille ATG8 et dégradées par autophagie.

La protéine NBR1 (neighbor of BRCA1) a également été identifiée comme un adaptateur ayant une structure et des fonctions similaires à p62 (Kirkin *et al.*, 2009b; Lamark *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2009). En effet, NBR1 interagit avec l'ensemble des membres de la famille ATG8 *via* son motif LIR et avec l'ubiquitine *via* son domaine UBA, permettant ainsi la dégradation des agrégats ubiquitinylés par autophagie (Kirkin *et al.*, 2009b) (**Figure 9B**).

NBR1 et p62 peuvent également interagir ensemble pour permettre la dégradation des substrats ubiquitinylés et réguler leur agrégation quand l'autophagie est inhibée (Kirkin *et al.*, 2009a). Plus récemment, d'autres adaptateurs de l'autophagie interagissant avec les membres de la famille ATG8 ont été mis en évidence comme la protéine ALFY (autophagy-linked FYVE protein, également appelée WDFY3). En effet, lors de l'autophagie, ALFY interagit avec p62 associée à des agrégats ubiquitinylés puis avec les protéines de la sous-famille GABARAP associées aux autophagosomes permettant la dégradation des substrats (Lystad *et al.*, 2014). La protéine GABARAPL1 est également impliquée dans l'autophagie sélective du glycogène appelée glycophagie (Jiang *et al.*, 2010b; Jiang *et al.*, 2011). En effet, GABARAPL1 interagit avec STBD1 (Starch-binding domain-containing protein 1) *via* son motif LIR permettant ainsi le ciblage du glycogène aux autophagosomes et sa dégradation par autophagie. Nous allons décrire plus particulièrement dans le chapitre suivant un type d'autophagie sélective : la mitophagie.

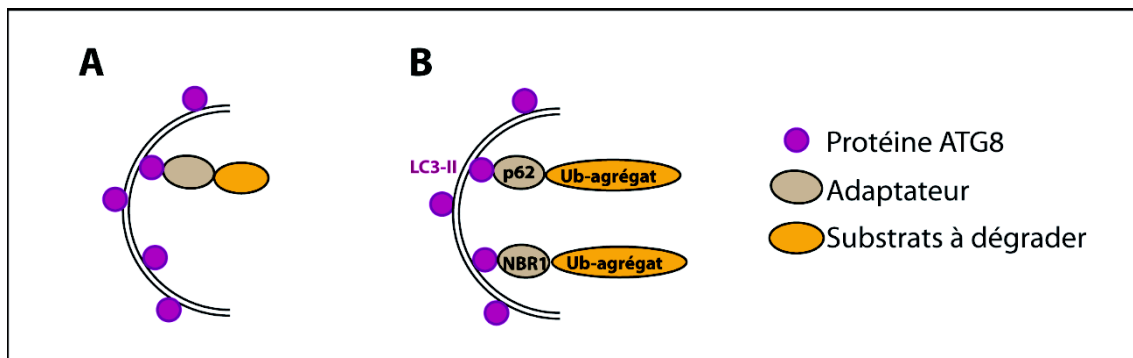


Figure 9 : Mécanisme de l'autophagie sélective. (A) L'autophagie sélective est réalisée grâce à un adaptateur qui va permettre le recrutement des substrats à dégrader aux autophagosomes. Pour cela, l'adaptateur interagit avec le substrat à dégrader et avec l'autophagosome *via* les membres de la famille ATG8. (B) Exemple de la dégradation des agrégats ubiquitinylés. Les adaptateurs p62 et NBR1 peuvent interagir avec l'agrégat *via* leur interaction avec l'ubiquitine et avec les autophagosomes *via* leur interaction avec les membres de la famille ATG8, par exemple LC3-II, pour permettre la dégradation de ces substrats par autophagie sélective.

3.2. Exemple de la mitophagie

La mitophagie est un processus de dégradation sélective des mitochondries qui permet : i) l'élimination d'un surplus de mitochondries saines (**Figure 10D**) et ii) l'élimination des

mitochondries endommagées, source d'ERO (espèces réactives de l'oxygène) nocives pour la cellule (**Figure 10 ②**) (Feng *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2007; Novak, 2012; Schweers *et al.*, 2007; Youle & Narendra, 2011). Ces deux processus présentent des mécanismes d'action distincts qui requièrent des protéines différentes : la protéine NIX/BNIP3L (Bcl-2/adénovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 long form) et les protéines PARKIN/PARK2 et PINK1 (PARK2/PTEN induced putative kinase 1), respectivement (**Figure 10**).

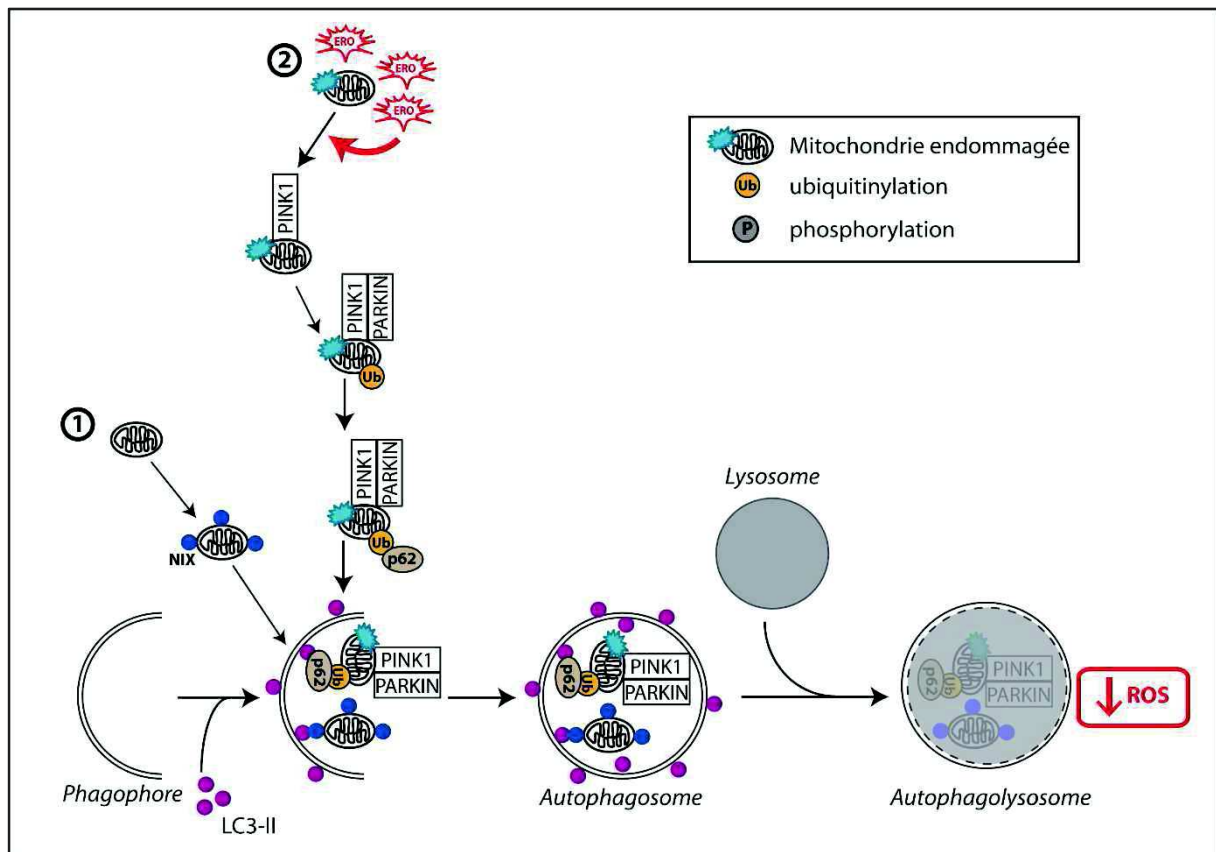


Figure 10 : Mécanisme de la mitophagie. ① Lors de la différenciation des cellules spécialisées, l'expression de la protéine NIX sur la face externe de la mitochondrie augmente. NIX va ainsi pouvoir interagir avec les membres de la famille ATG8 et permettre la séquestration et la dégradation des mitochondries. ② Lors de la dégradation des mitochondries endommagées, PINK1 s'accumule au niveau des mitochondries et recrute PARKIN. PARKIN peut ensuite ubiquitinyler les protéines mitochondriales qui seront reconnues par p62, permettant leur dégradation sélective par mitophagie.

L'élimination des mitochondries saines survient lors de la différenciation de certaines cellules spécialisées et est essentielle pour le développement correct des tissus et des organes. Cette élimination programmée des mitochondries intervient par exemple lors de la maturation des réticulocytes (Sandoval *et al.*, 2008; Schweers *et al.*, 2007). En effet, les réticulocytes de souris présentant une extinction de NIX/BNIP3L sont incapables d'éliminer leurs mitochondries conduisant à une inhibition de leur maturation en érythrocytes. Néanmoins, aucune modification de l'autophagie non sélective n'est observée. NIX/BNIP3L située à la membrane externe des mitochondries permet le recrutement de ces organites aux

autophagosomes. En effet, NIX/BNIP3L peut interagir grâce à son motif LIR avec LC3, GABARAP et GABARAPL1 localisées aux autophagosomes permettant ainsi la séquestration et la dégradation des mitochondries par mitophagie (Novak *et al.*, 2010) (**Figure 10 ①**).

Les protéines PARKIN et PINK1 sont impliquées dans la dégradation sélective des mitochondries endommagées et dysfonctionnelles en réponse à la dépolarisation de la membrane (Matsuda *et al.*, 2010) (**Figure 10 ②**). Les gènes codant PARKIN et PINK1 sont mutés dans la maladie de Parkinson, mettant en évidence l'importance de la dégradation des mitochondries endommagées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Kitada *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2004). Suite à un dommage aux mitochondries, PINK1 s'accumule au niveau de la membrane externe des mitochondries endommagées permettant la translocation de PARKIN, une ligase E3 de l'ubiquitine, du cytoplasme à la membrane de ces organites. Une fois localisée aux mitochondries, la protéine PARKIN ubiquitinye les protéines mitochondriales telles que VDAC1 (voltage dependent anion channel 1), mitofusine 1 et mitofusine 2 conduisant à leur reconnaissance par p62 et à leur dégradation par autophagie sélective comme décrit précédemment (**Voir paragraphe I.3.a. « Généralités »**) (Gegg *et al.*, 2010; Geisler *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2010) (**Figure 10 ②**). En effet, comme décrit précédemment, p62 en tant qu'adaptateur crée un lien entre les protéines mitochondriales ubiquitinylées et l'autophagosome. Néanmoins, l'implication de p62 dans l'induction de la mitophagie par PARKIN est encore soumise à controverse (Ding *et al.*, 2010; Geisler *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010b; Narendra *et al.*, 2010; Okatsu *et al.*, 2010). Dans les mitochondries saines, PINK1 est importée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie où elle est clivée par PMPCB (mitochondrial-processing peptidase) et PARL (presenilin-associated rhomboid-like protease) conduisant à sa dégradation. Ceci empêche l'accumulation de PINK1 au niveau de la membrane externe et donc la mitophagie de mitochondries saines (Jin *et al.*, 2010; Meissner *et al.*, 2011).

Récemment, il a été mis en évidence que la protéine AMBRA1 localisée à la membrane des mitochondries peut interagir avec LC3 *via* son motif LIR afin de favoriser la mitophagie dépendante de PARKIN (Strappazzon *et al.*, 2015). De plus, cette étude a suggéré qu'un fort taux de protéine AMBRA1 à la membrane des mitochondries peut induire une mitophagie indépendante de PARKIN et p62. Une implication de la protéine ULK1 dans la mitophagie a également été mise en évidence. En effet, la phosphorylation d'ULK1 par AMPK au niveau de sa Ser555 régule son recrutement au niveau des mitochondries endommagées permettant ainsi leur dégradation par mitophagie (Tian *et al.*, 2015).

4. Autophagie et fonctions biologiques

4.1. Induction de l'autophagie

L'autophagie se déroule à taux basal dans la cellule et permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en dégradant et recyclant les constituants cytoplasmiques endommagés pour fournir de l'énergie et des nutriments. L'autophagie peut également être induite par différents stress comme une carence en nutriments, une hypoxie ou encore un stress oxydatif permettant ainsi la dégradation des constituants cytoplasmiques en métabolites. Ces métabolites pourront ensuite être utilisés dans les processus anaboliques et la production d'énergie permettant ainsi une résistance aux stress et la survie des cellules (Kroemer *et al.*, 2010). Lors de ces stress, l'autophagie va maintenir le métabolisme cellulaire en fournissant les substrats nécessaires (Rabinowitz & White, 2010). Néanmoins, lorsque le stress est trop important, l'autophagie peut également conduire à la mort cellulaire par apoptose (mort cellulaire de type I) ou à la mort autophagique (mort cellulaire de type II) (Galluzzi *et al.*, 2008). La stimulation de l'autophagie par ces stress implique différentes voies de signalisation que nous détaillerons dans la suite de ce manuscrit dans le cas du stress oxydant et du stress du RE.

4.2. Autophagie et carence en nutriments

Une carence en nutriments (acides aminés ou glucose) conduit à l'induction de l'autophagie dans la plupart des cellules de mammifères (Boya *et al.*, 2005). Les principales molécules impliquées dans cette régulation sont mTOR et AMPK et plus récemment les sirtuines.

Ces dernières sont des désacétylases dépendantes du NAD qui perçoivent le stress environnemental (Haigis & Sinclair, 2010). Les sirtuines sont requises pour l'induction de l'autophagie par une carence en nutriments ou énergie indépendante de l'inhibition de mTOR ou d'un stress du RE (Lee *et al.*, 2008; Morselli *et al.*, 2010). SIRT1 peut désacétyler des protéines de l'autophagie telles que ATG5, ATG7, LC3 et FOXO3a (Factor forkhead box O3a) (Kume *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008) (**Figure 11A**). La désacétylation de FOXO3a conduit à une augmentation de l'expression de la protéine pro-autophagique BNIP3 (Kume *et al.*, 2010). Suite à une carence en sérum, une autre sirtuine, SIRT2, se dissocie de FOXO1 conduisant à son acétylation et favorisant son interaction avec ATG7 et l'induction de l'autophagie (Zhao *et al.*, 2010) (**Figure 11B**).

L'activation d'AMPK varie en fonction du statut énergétique de la cellule et plus particulièrement du ratio AMP/ATP. AMPK peut être activée après phosphorylation par différentes kinases : LKB1 (liver kinase B1) activée par une déplétion énergétique, CaMKK β (calcium/calmodulin kinase kinase β) activée par le calcium cytosolique et TAK-1 (TGF β activated kinase-1) activée par les cytokines pro-inflammatoires (Hawley *et al.*, 2003; Hawley *et al.*, 2005; Hurley *et al.*, 2005; Momcilovic *et al.*, 2006; Woods *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2003) (**Figure 11C**). SIRT1 et AMPK peuvent agir de façon coordonnée afin de réaliser une boucle positive d'amplification (Ruderman *et al.*, 2010). En effet, SIRT1 peut désacétyler LKB1 conduisant à une augmentation de son activité kinase et à sa translocation du noyau au cytoplasme où elle peut activer AMPK (**Figure 11C**). AMPK peut également stimuler l'activation de SIRT1 de manière indirecte en augmentant le NAD⁺ (Lan *et al.*, 2008; Ruderman *et al.*, 2010).

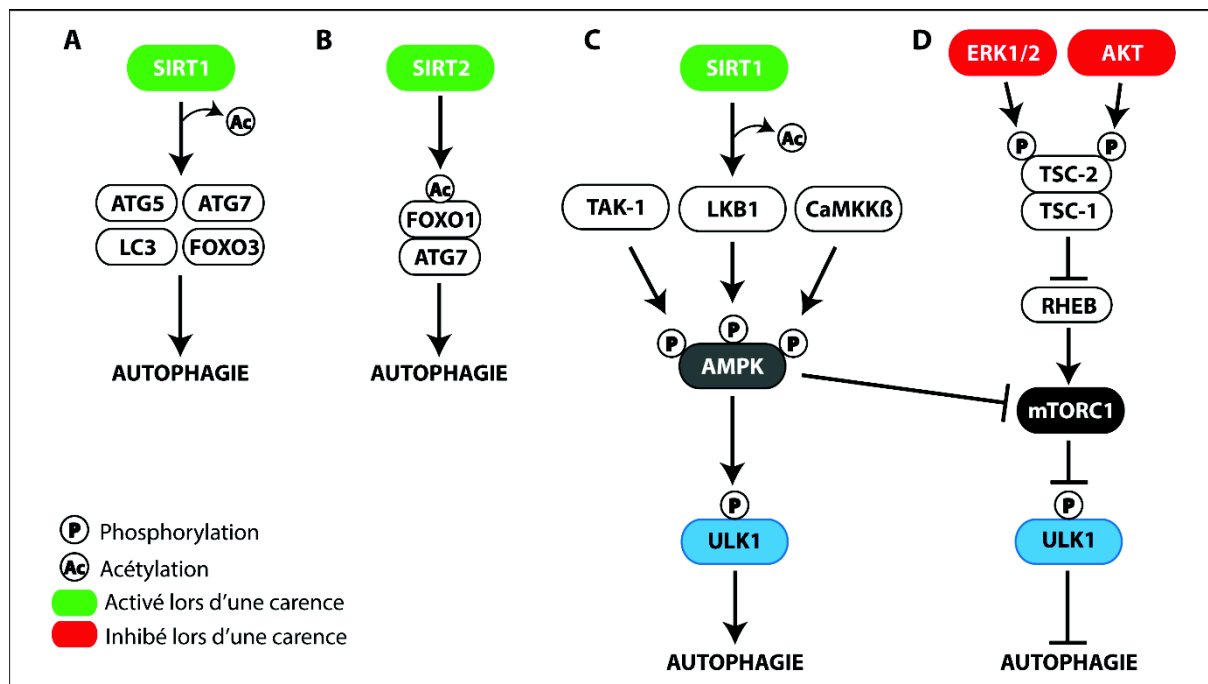


Figure 11 : Induction de l'autophagie suite à une carence en nutriments ou énergie. Suite à une carence en nutriments ou énergie, l'autophagie peut être induite par différents mécanismes : (A) SIRT1 désacétyle les protéines ATG5, ATG7, LC3 et FOXO3, (B) SIRT2 acétyle FOXO1 favorisant son interaction avec ATG7, (C) les kinases TAK-1, LKB1 et CaMKK β phosphorylent et activent AMPK conduisant à l'activation du complexe ULK1. La kinase LKB-1 peut être désacétylée et activée par SIRT1, (D) les kinases ERK1/2 et AKT inactives ne phosphorylent pas TSC1/TSC2 conduisant à l'activation de ces deux sous-unités et ainsi à l'inhibition de RHEB et de mTORC1.

Le mécanisme le plus étudié par lequel AMPK régule positivement l'autophagie est par inhibition de mTOR. En effet, comme décrit précédemment (*Voir paragraphe I.2.b « Initiation de l'autophagie : Complexe ULK1 »*), lors d'une carence énergétique, AMPK inhibe mTOR et active ULK1 conduisant à l'induction de l'autophagie (Efeyan & Sabatini, 2010; Gwinn *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010a). mTOR peut également être régulée par des molécules

autres qu'AMPK. En présence de facteurs de croissance, AKT et ERK1/2 sont activées et phosphorylent une des deux sous-unités TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis complex 1/2) conduisant à leur inhibition. Ceci conduit à l'activation de la GTPase RHEB qui peut alors activer mTOR et inhiber l'autophagie (Huang & Manning, 2009; Long *et al.*, 2005a; Long *et al.*, 2005b; Neufeld, 2010) (**Figure 11D**). En présence d'acides aminés, mTOR peut également être activée de façon indépendante de la signalisation AKT/TSC1-TSC2 par les protéines de la famille des GTPases RAG. Ces protéines interagissent directement avec RAPTOR et recrutent mTOR à la surface des lysosomes où cette dernière sera activée par RHEB (Efeyan & Sabatini, 2010; Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2010; Sancak *et al.*, 2008).

4.3. Autophagie et stress oxydant

Un stress oxydant est caractérisé par une présence élevée d'ERO. Ces ERO représentent un groupe de molécules incluant l'anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyl (OH^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces molécules sont synthétisées au sein de la cellule par le métabolisme de l'oxygène et agissent comme des molécules de signalisation importantes lorsqu'elles sont présentes à faible taux (Gough & Cotter, 2011).

Les ERO ont été identifiées comme des inducteurs précoces de l'autophagie suite à une carence en nutriments (Filomeni *et al.*, 2015; Filomeni *et al.*, 2010; Levonen *et al.*, 2014). Lors d'une carence en nutriments, H_2O_2 oxyde ATG4 ce qui bloque principalement son activité de délipidation et conduit à une augmentation de la formation de LC3-II (Scherz-Shouval *et al.*, 2007) (**Figure 12 ①**). De plus, les ERO peuvent inhiber mTOR directement (Liu *et al.*, 2008) ou indirectement par le biais par exemple d'AMPK conduisant à l'induction de l'autophagie. En effet, une carence en oxygène induit une augmentation du ratio AMP/ATP et active AMPK qui peut ainsi, comme décrit précédemment (**Voir paragraphe 1.2.b « Initiation de l'autophagie : Complexe ULK1 »**) inhiber mTOR ou phosphoryler ULK1 (Alexander *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2011a; Egan *et al.*, 2011b; Gwinn *et al.*, 2008; Inoki *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011a). AMPK est sensible au stress oxydatif et peut être phosphorylée par la kinase AMPKK (AMPK kinase) suite à l'accumulation d' H_2O_2 , conduisant à son activation et à une induction indirecte de l'autophagie (Choi *et al.*, 2001) (**Figure 12 ②**). Les ERO peuvent également activer des MAPK telles que JNK1 qui active l'autophagie (Wong *et al.*, 2010) ou peuvent moduler l'activité de facteurs de transcription tels que NF- κ B (Nuclear factor kappa B) conduisant à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie comme *bécline 1* ou *p62* (Boyer-Guittaut *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2008; Djavaheri-Mergny *et al.*, 2006).

L'hypoxie (diminution de l'apport en oxygène) est également un inducteur de l'autophagie. L'hypoxie induit la production d'ERO conduisant à la stabilisation de HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α) (Chandel *et al.*, 2000). HIF-1 α induit la transcription de *bnip3* et *nix* qui vont perturber l'interaction inhibitrice entre BECLINE 1 et BCL-2 permettant le relargage de BECLINE 1 et son activation (Bellot *et al.*, 2009) (**Figure 12** ③). Il a également été mis en évidence que cette augmentation de l'expression de BNIP3 conduit à l'induction de la mitophagie (Zhang *et al.*, 2008). Pendant l'hypoxie, l'autophagie peut également être induite par AMPK ou la réponse UPR (Unfolded protein response) de manière indépendante de HIF-1 α (Mazure & Pouyssegur, 2010; Papandreou *et al.*, 2008; Rouschop *et al.*, 2010).

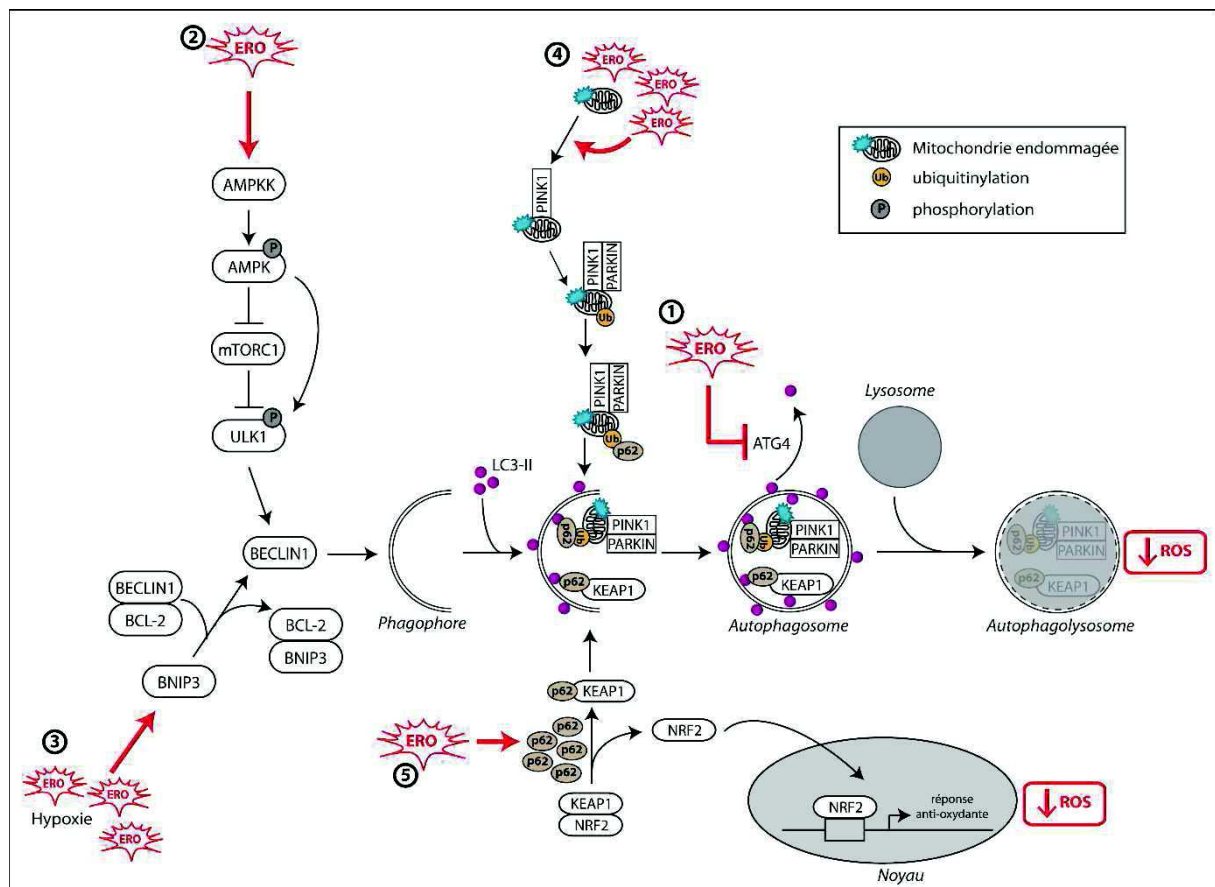




Figure 12 : Lien entre autophagie et stress oxydant. Les ERO régulent l'autophagie par différents mécanismes tels que : ① L'oxydation d'ATG4 conduisant à l'accumulation d'autophagosomes, ② l'activation de la voie AMPK induisant ainsi l'activation du complexe ULK1, ③ la rupture de l'interaction BECLINE 1 et BCL-2 conduisant ainsi à la libération de BECLINE 1 disponible pour l'autophagie, ④ l'altération de l'homéostasie mitochondriale conduisant à l'activation de la mitophagie. L'autophagie inhibe ainsi l'accumulation d'ERO par l'élimination des mitochondries endommagées, ⑤ la dégradation de KEAP1 par autophagie sélective et l'expression des gènes antioxydants régulés par NRF2.

Les mitochondries représentent la source majeure d'ERO intracellulaires par la fuite d'électrons lors de la phosphorylation oxydative (Murphy, 2009; St-Pierre *et al.*, 2002). Lors de dysfonctions mitochondriales, les ERO sont produites de manière très importante et peuvent conduire à une accumulation de protéines, lipides et ADN oxydés, un déséquilibre redox et à

un stress oxydant (Cross *et al.*, 1987; Fruehauf & Meyskens, 2007; Poli *et al.*, 2004). Dans ce cas, l'autophagie sélective va être induite pour éliminer les mitochondries endommagées par mitophagie grâce à la voie PARKIN-PINK1 (**Voir paragraphe I.3.b « Exemple de la mitophagie »**) permettant ainsi l'élimination de la source du stress oxydatif et la protection des cellules contre les dommages qui en découlent (Hill *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2007; Zhang, 2013) (**Figure 12** ).

L'autophagie peut également éliminer le stress oxydatif en régulant la voie NRF2/KEAP1 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2/kelch-like ECH-associated protein 1) et p62 (Komatsu *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2010). p62 phosphorylée peut interagir avec KEAP1 et l'emmener aux autophagosomes conduisant à sa dégradation sélective (Ichimura *et al.*, 2013; Taguchi *et al.*, 2012). Ceci conduit à la libération de NRF2 qui peut alors être transloquée au noyau et activer des gènes antioxydants : *glutathion peroxidase*, *superoxide dismutase* et *thioredoxine* par exemple (Ma, 2013; Villeneuve *et al.*, 2010) (**Figure 12** ). En condition normale, NRF2 est séquestrée par KEAP1 et inactivée après dégradation par le protéasome. Lors d'un stress oxydatif, KEAP1 est inhibée suite à l'inhibition de son activité ubiquitine ou séquestrée par son interaction avec p62 conduisant à un blocage de la dégradation de NRF2 et son activation.

4.4. Autophagie et stress du RE

Suite à l'accumulation de protéines mal repliées, la réponse UPR diminue la synthèse protéique et restaure l'homéostasie cellulaire en régulant l'activité de facteurs de transcription permettant ainsi la survie des cellules (Hetz, 2012; Rutkowski & Hegde, 2010). La réponse UPR fait intervenir trois voies de signalisation : PERK (PKR-like eIF2a kinase ou EIF2AK3), ATF6 (activating transcription factor-6) et IRE1 (inositol requiring enzyme 1).

La réponse UPR peut induire l'autophagie pour permettre aux cellules de survivre face à ces conditions défavorables (Buchberger *et al.*, 2010). En effet, PERK induit l'autophagie principalement en régulant de façon transcriptionnelle les gènes impliqués dans ce mécanisme. Lors de la réponse UPR, PERK phosphoryle et inactive eIF2 α (eukaryotic initiation factor-2 α) conduisant à une inhibition de la synthèse protéique (Ron & Walter, 2007). Il a été mis en évidence que la voie PERK/eIF2 α augmente la transcription des ARNm *LC3*, *ATG5* et *ATG12* en régulant les facteurs de transcription ATF4 (Activating transcription factor 4) et CHOP (C/EBP Homologous protein) conduisant ainsi à une induction de l'autophagie (B'Chir *et al.*, 2013; Kouroku *et al.*, 2007; Milani *et al.*, 2009; Rouschop *et al.*, 2010; Talloczy *et al.*, 2002).

ATF6 peut également induire l'autophagie en participant avec PERK à l'activation du facteur de transcription CHOP. La voie PERK/eIF2 α peut également phosphoryler et activer NF- κ B conduisant ainsi à l'induction de l'autophagie (Deng *et al.*, 2004).

De son côté, IRE1 est également responsable de l'induction de l'autophagie (Ogata *et al.*, 2006). Lors de la réponse UPR, IRE1 interagit avec TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) conduisant à la phosphorylation de JNK1 (Urano *et al.*, 2000). JNK1 activée peut ensuite phosphoryler BCL-2 conduisant à sa dissociation de BECLIN 1 et à l'induction de l'autophagie (Lei & Davis, 2003; Wei *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 1999). La voie IRE1/TRAF2 peut également permettre l'activation de NF- κ B et l'induction de l'autophagie (Kaneko *et al.*, 2003). Néanmoins, d'autres études ont mis en évidence une inhibition de l'autophagie par IRE1. En effet, l'inhibition d'IRE1 ou de son effecteur en aval XBP-1 (X-box binding protein 1) conduit à l'induction de l'autophagie (Hetz *et al.*, 2009; Vidal & Hetz, 2013). ATF6, ayant pour cible XBP1, pourrait également réguler négativement l'autophagie. Lors d'un stress du RE, dans des cellules neuronales, il a également été mis en évidence que la voie IRE1/TRAF2 inhibe le flux autophagique (Lee *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent qu'IRE1 pourrait être impliquée dans un rétrocontrôle négatif de l'autophagie afin d'empêcher une induction excessive de l'autophagie par PERK.

5. Autophagie et pathologies

L'autophagie jouant un rôle dans de nombreux processus biologiques, sa dérégulation est souvent associée à des pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiaques, les maladies infectieuses, le diabète de type II, la mucoviscidose et le cancer (Levine & Kroemer, 2008; Wirawan *et al.*, 2012). Ces maladies sont caractérisées, pour la plupart, par une accumulation de protéines mutées ou mal repliées et à une déficience en autophagie ne permettant pas l'élimination de ces protéines. C'est le cas par exemple de la mucoviscidose, de nombreuses myopathies et des maladies neurodégénératives (Grumati *et al.*, 2010; Luciani *et al.*, 2010; Pickford *et al.*, 2008; Roze *et al.*, 2010; Spencer *et al.*, 2009). Il a été mis en évidence que l'autophagie peut, en éliminant les agrégats de protéines mutées ou mal repliées, prévenir la survenue de ces pathologies (Frake *et al.*, 2015; Knaevelsrud & Simonsen, 2010; Williams *et al.*, 2006). L'autophagie présente également un rôle dans le cancer. Néanmoins, le rôle de l'autophagie dans le cancer est complexe puisque l'autophagie peut avoir

un rôle pro- ou anti-tumoral selon le type de tumeur et le stade de développement. Nous détaillerons plus particulièrement ici ce lien étroit entre autophagie et cancer.

II. AUTOPHAGIE ET CANCER

1. Historique

1.1. Délétion des gènes de l'autophagie dans le cancer

Le cancer est l'une des premières maladies identifiées comme étant liées à des dysfonctions de l'autophagie (Levine & Kroemer, 2008; Mathew *et al.*, 2007a). Initialement, l'autophagie a été mise en évidence comme un mécanisme suppresseur de tumeur suite à l'observation de la délétion mono-allélique de *BECLINE 1*, dans de nombreux cancers du sein, des ovaires et de la prostate (Liang *et al.*, 1999). Une faible expression protéique de *BECLINE 1*, membre du complexe *PI3KC3*, a également été observée dans les tissus de cancer du sein, du cerveau et des ovaires comparativement aux tissus sains (Liang *et al.*, 1999; Miracco *et al.*, 2007). La surexpression du gène *BECLINE 1* dans les cellules de cancer du sein MCF-7 conduit à une augmentation de l'autophagie associée à une inhibition de la prolifération et de la clonogénicité *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* (Liang *et al.*, 1999). De plus, les souris hétérozygotes *BECLINE 1^{+/-}* développent de manière spontanée de nombreuses tumeurs malignes comme des lymphomes, des carcinomes du poumon et du foie (Liang *et al.*, 1999; Qu *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2003). Les cellules hépatiques et mammaires déficientes en *BECLINE 1* présentent également un pouvoir tumorigène plus important que les cellules sauvages (Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2007b). L'ensemble de ces résultats a suggéré un rôle suppresseur de tumeur de *BECLINE 1* et donc de l'autophagie. D'autres constituants du complexe *PI3KC3*, qui sont nécessaires à son activité autophagique, sont également délétés dans de nombreux cancers et présentent un rôle suppresseur de tumeur comme *UVRAG*, *BIF1* (bax-interacting factor 1) et *AMBRA1*. *UVRAG* est fréquemment délétée de manière mono-allélique dans les cancers du côlon. De plus, sa surexpression inhibe la prolifération et la tumorigénicité des cellules dérivées de cancer du côlon (Liang *et al.*, 2006). La délétion de *BIF1*, qui interagit avec *BECLINE 1* *via* *UVRAG*, ou d'un allèle d'*AMBRA1* conduit au développement de tumeurs spontanées (Cianfanelli *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2007).

Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres acteurs de l'autophagie. En effet, *ATG5* possède un rôle suppresseur de tumeur dans un modèle de xénogreffe de souris (Yousefi *et al.*, 2006). De plus, les souris présentant une déficience en autophagie suite à l'extinction


d'*ATG5* dans l'ensemble des cellules de l'organisme ou suite à l'extinction d'*ATG7* dans un organe spécifique tel que le foie développe de manière spontanée des tumeurs bénignes du foie (Takamura *et al.*, 2011). L'extinction d'*ATG4C*, une cystéine protéase impliquée dans la lipodation de LC3, favorise le développement de fibrosarcome induit chimiquement chez la souris (Marino *et al.*, 2007).

Au-delà du rôle des protéines ATG comme suppresseur de tumeur, la régulation de l'autophagie semble également étroitement liée au cancer (Botti *et al.*, 2006; Morselli *et al.*, 2011). En effet, plusieurs oncogènes, fréquemment activés dans le cancer, sont connus pour inhiber l'autophagie comme par exemple PI3K, AKT et BCL-2 (Cully *et al.*, 2006; Maiuri *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2005). Au contraire, les gènes suppresseurs de tumeur, fréquemment mutés ou délétés dans le cancer, stimulent l'autophagie comme par exemple p53, PTEN (Phosphatase and tensin homolog), DAPK (death-associated protein kinase) ou TSC1/TSC2 (Crighton *et al.*, 2006; Cully *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2005; Gozuacik & Kimchi, 2006; Schwartz *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie. Néanmoins, le rôle de l'autophagie dans le cancer est beaucoup plus complexe. En fonction du type de tumeur et du stade de développement, l'autophagie peut avoir un rôle pro-tumoral ou anti-tumoral (Avalos *et al.*, 2014; Kenific & Debnath, 2015; White, 2012). Le rôle de l'autophagie au cours des différentes étapes de la croissance tumorale : de la tumorigenèse à la formation des métastases est décrit ci-dessous.

2. Autophagie et tumorigenèse

2.1. Régulation des stress oxydants, des dommages à l'ADN et de l'inflammation

Lors des étapes précoces de la tumorigenèse, transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse, l'autophagie agit comme un suppresseur de tumeur. En effet, l'autophagie protège les cellules contre une production excessive d'ERO. Il a été mis en évidence qu'une augmentation de la production d'ERO accélère la mutagenèse, augmente l'activité des oncogènes conduisant à la stimulation de la tumorigenèse (Goetz & Luch, 2008; Marnett, 2000) (**Figure 13** ). L'autophagie élimine les ERO par le biais de la mitophagie ou de la voie NRF2/KEAP1 comme décrit précédemment (*Voir paragraphe 1.4.c « Autophagie et stress oxydant »*) (Debnath, 2011; Morselli *et al.*, 2009). Ainsi, dans de nombreux modèles, l'inhibition de l'autophagie suite à l'extinction d'*ATG5* et *ATG7* conduit à un stress oxydatif

chronique, une accumulation de mitochondries endommagées, des dommages tissulaires, de l'inflammation et de l'instabilité génomique qui favorisent l'initiation tumorale (Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007; Komatsu *et al.*, 2005; Mathew *et al.*, 2007b; Takamura *et al.*, 2011).

L'autophagie peut également inhiber la tumorigenèse en éliminant les agrégats ubiquitinylés et p62. En effet, une déficience en autophagie conduit à une accumulation d'agrégats protéiques et de p62 associés à une augmentation de la production d'ERO et à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Komatsu *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2009). De plus, le développement tumoral observé dans les cellules déficientes en autophagie est inhibé suite à l'inactivation de p62, suggérant que p62 favorise la formation des tumeurs (Guo *et al.*, 2011b; Inami *et al.*, 2011; Mathew *et al.*, 2009; Takamura *et al.*, 2011).

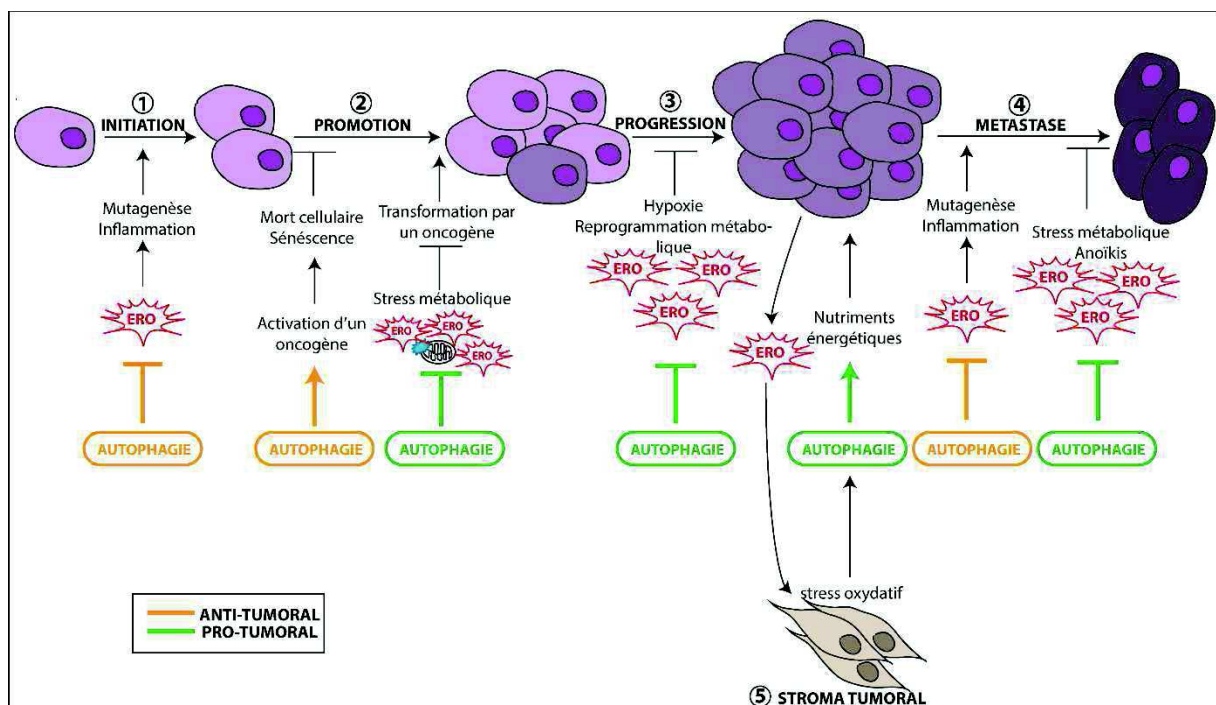



Figure 13 : Rôles pro- et anti-tumoral de l'autophagie dans le cancer. Le rôle de l'autophagie dans le cancer varie en fonction du stade de développement. Durant les étapes précoces du développement tumoral, l'autophagie joue un rôle protecteur en éliminant les dommages à l'ADN et l'inflammation induite par les ERO conduisant à l'inhibition de la tumorigenèse (①②). Durant les stades plus tardifs, l'autophagie présente un rôle pro-tumoral en éliminant les stress métaboliques et en produisant les nutriments nécessaires à la survie des cellules cancéreuses (③④). Il existe également une forte interaction entre les cellules du stroma tumoral et les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses en hypoxie induisent la formation d'ERO qui va activer l'autophagie dans les cellules du stroma produisant ainsi des nutriments énergétiques nécessaires à la survie des cellules cancéreuses et à leur prolifération⑤.

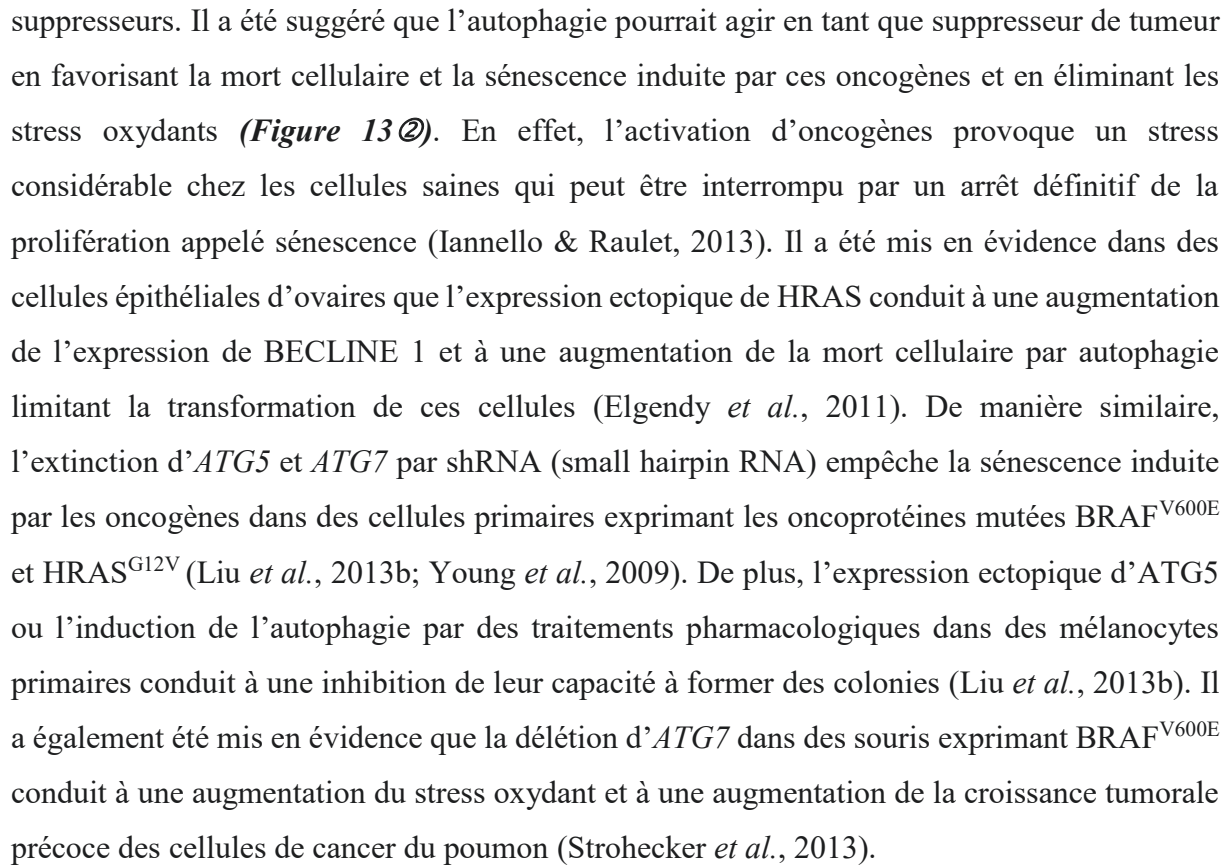
L'autophagie est également impliquée dans plusieurs étapes de la réponse immunitaire innée et adaptative et participe ainsi à la réponse immunitaire anti-tumorale qui empêche l'établissement et la prolifération des cellules cancéreuses (Deretic *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie empêche la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire conduisant à la survie de ces cellules. L'autophagie lutte aussi contre

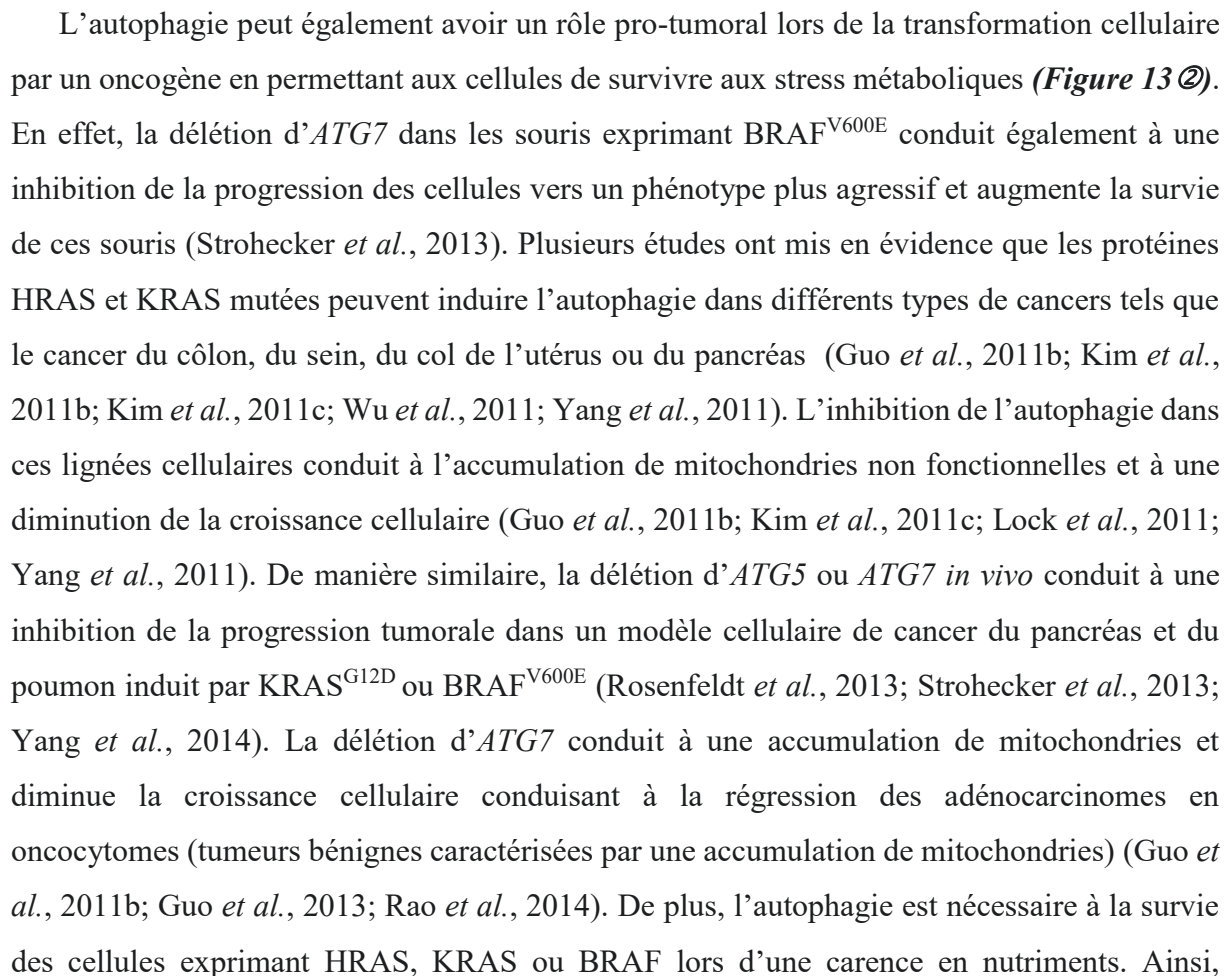
l'inflammation, décrite comme un risque important dans l'initiation du cancer tel que le cancer du foie (Brenner *et al.*, 2013; Deretic *et al.*, 2013; Levine *et al.*, 2011; Sakurai *et al.*, 2008) (**Figure 13** ). En effet, la tumorigenèse est stimulée par un microenvironnement inflammatoire qui présente un fort taux d'ERO et de nombreuses cytokines (Coussens *et al.*, 2013). Plusieurs études ont montré qu'une déficience en autophagie suite à la délétion d'*ATG16L*, *BECLINE 1* ou *LC3* induit l'accumulation de mitochondries endommagées et d'ERO conduisant à l'induction de l'inflammation associée à une augmentation du taux d'IL-1 β (Interleukine-1 β) et IL-18 (Interleukine-18) (Bensaad *et al.*, 2009; Nakahira *et al.*, 2011; Saitoh *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011). En effet, les ERO activent les facteurs pro-inflammatoires tels que l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3), un complexe multi-protéiques responsable de la maturation et de la sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires (Bensaad *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011). D'autres études ont également confirmé le rôle négatif de l'autophagie dans l'inflammation (Dupont *et al.*, 2011; Lupfer *et al.*, 2013). De plus, il a été mis en évidence que des protéines de l'inflammasome peuvent être ubiquitinyllées permettant leur interaction avec p62 et la dégradation du complexe par autophagie sélective (Shi *et al.*, 2012). Un défaut d'autophagie conduit donc à un environnement inflammatoire qui contribue à l'initiation du cancer. Néanmoins, le lien entre cytokines inflammatoires et cancer reste encore à établir du fait du rôle pro- et anti-tumoral de ces molécules en fonction du contexte tumoral.

2.2. Activation d'oncogènes et transformation cellulaire

La transformation cellulaire requiert l'intervention de gènes spécifiques, impliqués dans la prolifération cellulaire, appelés proto-oncogènes. Suite aux instabilités génomiques et aux mutations, ces proto-oncogènes vont devenir des oncogènes qui vont favoriser la croissance incontrôlée des cellules conduisant à la survenue du cancer. Il existe de nombreux oncogènes connus pour moduler l'autophagie tels que MYC (myelocytomatosis oncogene) (Tsuneoka *et al.*, 2003) ou encore RAF et RAS. Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux protéines de la famille RAS présentes sous plusieurs isoformes N, K et H et mutées dans 33% des cancers humains (Jemal *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2009; Karnoub & Weinberg, 2008). L'oncogène *ras* code une protéine G monomérique impliquée dans la régulation de la division cellulaire en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance.

Lors de la transformation cellulaire, l'activation d'oncogènes conduit à un stress important des cellules induisant ainsi la mort cellulaire et la sénescence, deux mécanismes onco-


suppresseurs. Il a été suggéré que l'autophagie pourrait agir en tant que suppresseur de tumeur en favorisant la mort cellulaire et la sénescence induite par ces oncogènes et en éliminant les stress oxydants (**Figure 13** ). En effet, l'activation d'oncogènes provoque un stress considérable chez les cellules saines qui peut être interrompu par un arrêt définitif de la prolifération appelé sénescence (Iannello & Raulet, 2013). Il a été mis en évidence dans des cellules épithéliales d'ovaires que l'expression ectopique de HRAS conduit à une augmentation de l'expression de BECLINE 1 et à une augmentation de la mort cellulaire par autophagie limitant la transformation de ces cellules (Elgendy *et al.*, 2011). De manière similaire, l'extinction d'*ATG5* et *ATG7* par shRNA (small hairpin RNA) empêche la sénescence induite par les oncogènes dans des cellules primaires exprimant les oncoprotéines mutées BRAF^{V600E} et HRAS^{G12V} (Liu *et al.*, 2013b; Young *et al.*, 2009). De plus, l'expression ectopique d'*ATG5* ou l'induction de l'autophagie par des traitements pharmacologiques dans des mélanocytes primaires conduit à une inhibition de leur capacité à former des colonies (Liu *et al.*, 2013b). Il a également été mis en évidence que la délétion d'*ATG7* dans des souris exprimant BRAF^{V600E} conduit à une augmentation du stress oxydant et à une augmentation de la croissance tumorale précoce des cellules de cancer du poumon (Strohecker *et al.*, 2013).

L'autophagie peut également avoir un rôle pro-tumoral lors de la transformation cellulaire par un oncogène en permettant aux cellules de survivre aux stress métaboliques (**Figure 13** ). En effet, la délétion d'*ATG7* dans les souris exprimant BRAF^{V600E} conduit également à une inhibition de la progression des cellules vers un phénotype plus agressif et augmente la survie de ces souris (Strohecker *et al.*, 2013). Plusieurs études ont mis en évidence que les protéines HRAS et KRAS mutées peuvent induire l'autophagie dans différents types de cancers tels que le cancer du côlon, du sein, du col de l'utérus ou du pancréas (Guo *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011c; Wu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). L'inhibition de l'autophagie dans ces lignées cellulaires conduit à l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles et à une diminution de la croissance cellulaire (Guo *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011c; Lock *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). De manière similaire, la délétion d'*ATG5* ou *ATG7* *in vivo* conduit à une inhibition de la progression tumorale dans un modèle cellulaire de cancer du pancréas et du poumon induit par KRAS^{G12D} ou BRAF^{V600E} (Rosenfeldt *et al.*, 2013; Strohecker *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). La délétion d'*ATG7* conduit à une accumulation de mitochondries et diminue la croissance cellulaire conduisant à la régression des adénocarcinomes en oncocytomes (tumeurs bénignes caractérisées par une accumulation de mitochondries) (Guo *et al.*, 2011b; Guo *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2014). De plus, l'autophagie est nécessaire à la survie des cellules exprimant HRAS, KRAS ou BRAF lors d'une carence en nutriments. Ainsi,

l'inhibition de la transformation par HRAS, KRAS ou BRAF suite à l'inhibition de l'autophagie est associée à une diminution de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse (Guo *et al.*, 2011b; Lock *et al.*, 2011; Strohecker *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011). En effet, KRAS et BRAF conduisent à une diminution du taux d'acétyl-CoA nécessaire au cycle TCA (Tricarboxylic acid) par différents mécanismes (Chun *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2009). Les cellules cancéreuses exprimant RAS ou RAF requièrent donc l'autophagie afin de subvenir à leurs besoins métaboliques rendant ainsi ces cellules dépendantes à ce mécanisme pour leur survie.

3. Autophagie et progression tumorale

3.1. Régulation de l'hypoxie et des stress métaboliques

Lors de la progression tumorale, l'autophagie représente un mécanisme pro-tumoral en permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter à l'ischémie (carence en glucose et hypoxie) dans un environnement défavorable à leur croissance et leur survie (**Figure 13** ). Les régions hypoxiques de la tumeur sont caractérisées par un taux élevé d'autophagie associé à une survie des cellules cancéreuses (Debnath, 2011; Degenhardt *et al.*, 2006; Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2007b). En effet, l'autophagie peut être induite par l'hypoxie comme décrit précédemment (**Voir paragraphe 1.4.c « Autophagie et stress oxydant »**). L'inhibition de l'autophagie suite à l'extinction de *BECLIN 1*, *ATG5* ou *ATG7* conduit à une mort cellulaire induite par l'hypoxie. L'induction de l'autophagie est donc nécessaire pour éliminer la production d'ERO induite par hypoxie et constitue alors un mécanisme de survie (Brahimi-Horn *et al.*, 2011; Mazure & Pouyssegur, 2010; Rouschop *et al.*, 2009).

De plus, les cellules cancéreuses requièrent des besoins énergétiques supérieurs aux cellules normales. Ces besoins peuvent être satisfaits par une induction de l'autophagie permettant ainsi l'obtention d'ATP et d'intermédiaires métaboliques (Eng & Abraham, 2011; Rabinowitz & White, 2010; White, 2012). En effet, la dégradation des protéines par autophagie génère des acides aminés qui alimenteront le cycle TCA pour maintenir le métabolisme mitochondrial. Les lipides et les glucides dégradés peuvent également être utilisés pour fournir du pyruvate et de l'acétyl-CoA au cycle TCA. De ce fait, une déficience en autophagie dans les cellules tumorales conduit à un déficit en ATP, une déplétion des intermédiaires du cycle TCA et une production aberrante d'ERO (Guo *et al.*, 2011b; Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2009; Mathew *et al.*, 2007b; Yang *et al.*, 2011). L'ensemble de ces études suggère un rôle de l'autophagie dans la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses leur permettant ainsi

d'obtenir les substrats nécessaires à une prolifération rapide.

3.2. Autophagie, métastases et transition épithélio-mésenchymateuse

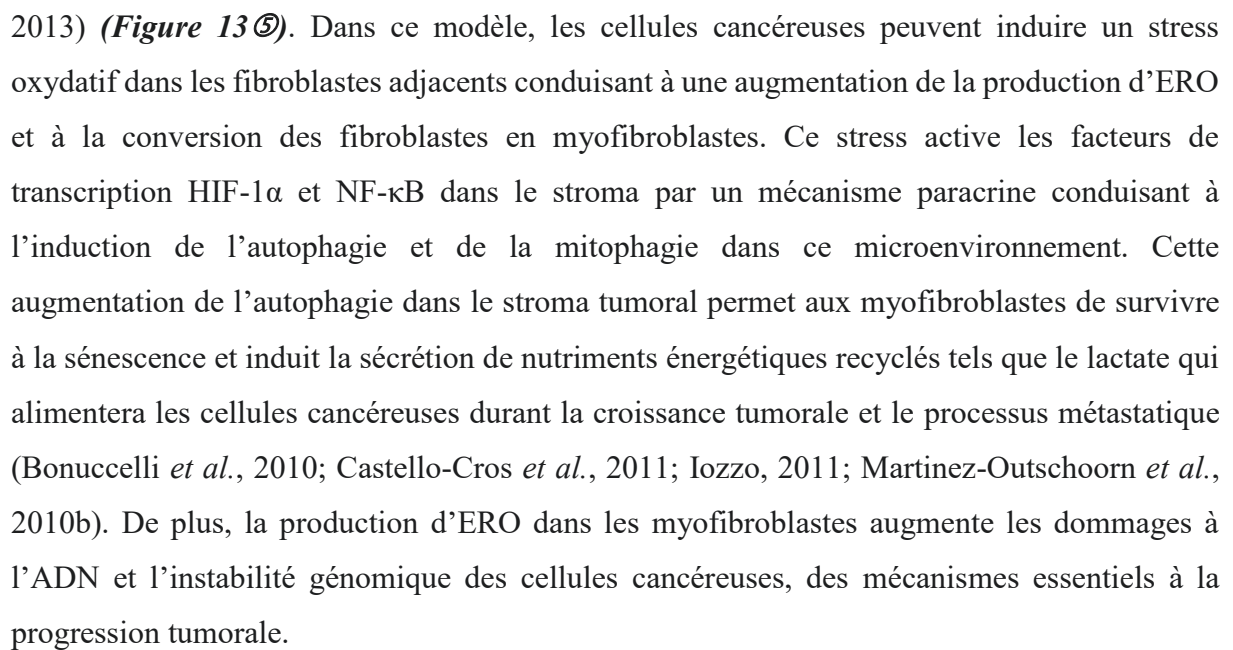
La progression tumorale et l'agressivité sont caractérisées par la formation de métastases, qui requiert la capacité des cellules cancéreuses à migrer vers des organes à distance du site initial (Sethi & Kang, 2011; Valastyan & Weinberg, 2011). Le rôle de l'autophagie lors de la formation des métastases est complexe puisque des études ont mis en évidence un rôle pro- et anti-métastatique de l'autophagie (Kenific *et al.*, 2010) (**Figure 13**). Durant les stades précoces des métastases, l'autophagie présente un rôle anti-métastatique. En effet, l'autophagie facilite la survie des cellules tumorales en conditions de stress métabolique et d'hypoxie en restreignant la nécrose et l'inflammation, deux mécanismes nécessaires aux métastases (Degenhardt *et al.*, 2006; DeNardo *et al.*, 2008; Tlsty & Coussens, 2006). L'autophagie peut également activer la libération de HMGB1 (High mobility group box 1) conduisant à l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale et à l'inhibition des métastases (Apetoh *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010). Durant les stades plus avancés, l'autophagie a un rôle pro-métastatique. L'inhibition de l'autophagie après délétion de *FIP200* conduit à une diminution du potentiel métastatique associée à une accumulation de mitochondries endommagées (Wei *et al.*, 2011). De plus, une augmentation de l'autophagie est associée à une augmentation des métastases et à un mauvais pronostic chez les patients atteints de mélanomes et de cancer du sein (Lazova *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2011). En effet, l'autophagie permet la résistance des cellules pré-métastatiques à l'anoïkis, une mort cellulaire induite suite à leur détachement de la matrice extracellulaire (Debnath, 2008; Lock & Debnath, 2008). Le détachement des cellules de la tumeur primaire induit des modifications du métabolisme cellulaire telles qu'une diminution du taux d'ATP et une augmentation de la production d'ERO conduisant à l'induction de l'autophagie et à une résistance à l'anoïkis (Buchheit *et al.*, 2012; Fung *et al.*, 2008; Lock *et al.*, 2011; Paoli *et al.*, 2013). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules de carcinome hépatocellulaire conduit à une diminution des métastases de poumon en réduisant la résistance à l'anoïkis et la colonisation du poumon par les cellules (Peng *et al.*, 2013). L'induction de l'autophagie lors du détachement de la matrice extracellulaire permet ainsi le maintien du métabolisme des cellules jusqu'à leur attachement à une nouvelle matrice extracellulaire (Guadamillas *et al.*, 2011; Lock & Debnath, 2008). L'autophagie peut également favoriser les métastases en induisant la dormance des cellules métastatiques qui ne parviennent pas à interagir avec la matrice extracellulaire du nouveau site (Lu *et al.*, 2008).

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est caractérisée par la perte des propriétés épithéliales associée à l'acquisition des propriétés mésenchymateuses conduisant à une augmentation de la mobilité cellulaire et permettant ainsi la formation de métastases (Lamouille *et al.*, 2014). Comme sur la formation de métastases, l'autophagie possède un rôle double sur la TEM. Il a été mis en évidence que l'autophagie augmente l'invasion des cellules de carcinome hépatocellulaire en augmentant la TEM (Li *et al.*, 2013). Une autre étude a également suggéré que l'autophagie favorise l'invasion des cellules de cancer des voies biliaires en induisant la TEM (Nitta *et al.*, 2014). L'induction de l'autophagie par HIF-1 α dans des cellules de cancer du pancréas conduit également à une augmentation de la TEM (Zhu *et al.*, 2014). Au contraire, il a été montré que l'autophagie peut inhiber la migration et l'invasion cellulaire en réduisant la TEM suite à une diminution de l'expression de SNAIL et SLUG, deux facteurs de transcription régulateurs de ce processus (Catalano *et al.*, 2015). De plus, l'autophagie peut inhiber la TEM en permettant la dégradation de SNAIL et TWIST, deux facteurs de transcription régulant ce processus, par autophagie sélective (Lv *et al.*, 2012; Qiang & He, 2014). Il a également été mis en évidence que la TEM peut induire l'autophagie de manière indirecte en régulant des répresseurs ou inducteurs de ce mécanisme. Cette autophagie induite par la TEM semble permettre aux cellules cancéreuses de résister aux traitements en régulant la réactivité des lymphocytes T cytotoxiques (Akalay *et al.*, 2013).

3.3. Autophagie et stroma tumoral

Le microenvironnement tumoral ou stroma tumoral est un compartiment complexe qui encercle la tumeur et est composé de myofibroblastes ou fibroblastes associés aux cellules cancéreuses, de matrice extracellulaire, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et lymphoïdes et d'autres molécules extracellulaires (Kalluri & Zeisberg, 2006). Ce stroma, et en particulier les myofibroblastes, influence la croissance et la progression tumorale. En effet, les myofibroblastes peuvent favoriser la survie des cellules cancéreuses, la vascularisation de la tumeur, la mobilité des cellules, les métastases, la TEM et la résistance aux traitements anti-cancéreux (Andre *et al.*, 2010; Giannoni *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003; Pietras & Ostman, 2010; Vered *et al.*, 2007; Vered *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1996).

Le stroma tumoral est caractérisé par la présence de différents stress tels que l'hypoxie, un taux élevé d'ERO, des stress métaboliques et une carence en facteurs de croissance qui peuvent induire l'autophagie en particulier dans les myofibroblastes (Maes *et al.*, 2013; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010a; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2011b; Martinez-Outschoorn *et al.*,

2010c; Pavlides *et al.*, 2010; Sotgia *et al.*, 2012a). De nombreuses études ont mis en évidence des différences d'activité autophagique entre la tumeur et le stroma tumoral et un nouveau modèle appelé «Autophagie du stroma tumoral» a été proposé par les auteurs (Bensaad *et al.*, 2006; Lisanti *et al.*, 2010; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2011a; Pavlides *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013) (**Figure 13** ). Dans ce modèle, les cellules cancéreuses peuvent induire un stress oxydatif dans les fibroblastes adjacents conduisant à une augmentation de la production d'ERO et à la conversion des fibroblastes en myofibroblastes. Ce stress active les facteurs de transcription HIF-1 α et NF- κ B dans le stroma par un mécanisme paracrine conduisant à l'induction de l'autophagie et de la mitophagie dans ce microenvironnement. Cette augmentation de l'autophagie dans le stroma tumoral permet aux myofibroblastes de survivre à la sénescence et induit la sécrétion de nutriments énergétiques recyclés tels que le lactate qui alimentera les cellules cancéreuses durant la croissance tumorale et le processus métastatique (Bonuccelli *et al.*, 2010; Castello-Cros *et al.*, 2011; Iozzo, 2011; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010b). De plus, la production d'ERO dans les myofibroblastes augmente les dommages à l'ADN et l'instabilité génomique des cellules cancéreuses, des mécanismes essentiels à la progression tumorale.

Contrairement au modèle initial appelé « Warburg Effect » suggérant que les cellules cancéreuses dépendaient principalement de la glycolyse durant la croissance tumorale, les cellules cancéreuses sont maintenant décrites comme présentant une diminution du flux autophagique, une phosphorylation oxydative élevée et une forte production d'ERO. Les cellules du stroma, quant à elles, présentent un flux autophagique élevé permettant le recyclage des nutriments nécessaires aux cellules cancéreuses adjacentes. Ce modèle a été confirmé par une analyse transcriptionnelle qui a démontré que plus de 95 gènes codant des protéines de la biogenèse et des fonctions mitochondriales sont régulés positivement dans les cellules humaines de cancer du sein (Sotgia *et al.*, 2012b). Parmi ces gènes, 40 sont impliqués dans la traduction des protéines mitochondriales de la phosphorylation oxydative. De manière intéressante, ces gènes ne sont pas exprimés ou à faible taux dans les cellules du stroma et l'expression de certains gènes est associée à un mauvais pronostic. Les cellules cancéreuses peuvent donc reprogrammer les myofibroblastes pour leur permettre d'entrer en glycolyse et de sécréter des nutriments énergétiques qui alimenteront directement la phosphorylation oxydative des cellules cancéreuses.

4. Membres de la famille ATG8 et cancer

Au cours de mon travail de thèse, j'ai plus particulièrement étudié comme acteurs de l'autophagie, les membres de la famille ATG8. De nombreuses études ont pu mettre en évidence un lien entre les membres de cette famille et le cancer.

4.1. Sous-famille LC3

L'expression de LC3 dans les tumeurs rend bien compte du rôle complexe de l'autophagie dans le cancer en fonction du stade de développement et du type de tumeurs. Certaines études n'ont pas discriminé les différentes isoformes de LC3 telles que LC3A, LC3B et LC3C, j'utiliserai dans ces cas-là le terme LC3. Différentes études ont mis en évidence une diminution de l'expression de LC3B dans les cancers du cerveau, de l'ovaire, de l'utérus et du rein mais également dans les cancers de la prostate, de l'hypopharynx et du poumon (Aoki *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013a; Shen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2012). Il a également été mis en évidence que l'expression de LC3 diminue lors la progression tumorale dans les mélanomes (Miracco *et al.*, 2010). Au contraire, une augmentation de l'expression de LC3B a été observée dans les cancers de l'œsophage, du colon, de l'intestin, du foie, de la cavité buccale et dans les cancers du sein triple négatif (TN) (Chen *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2014; Lefort *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014; Yoshioka *et al.*, 2008). L'augmentation de l'expression de LC3B dans les cancers colorectaux avancés a également été associée à une résistance au traitement anti-cancéreux cetuximab, un anticorps monoclonal ciblant l'EGFR (epidermal growth factor receptor) surexprimé à la surface de certaines cellules tumorales (Guo *et al.*, 2011a). De plus, l'expression de LC3B est associée à un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du pancréas, de l'œsophage, du foie, de la cavité buccale mais également de cancer gastro-intestinaux, de glioblastome et de mélanome (Aoki *et al.*, 2008; Fujii *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2013b; Tang *et al.*, 2013; Yoshioka *et al.*, 2008). En effet, dans ces cancers, l'expression de LC3B est corrélée à la formation de métastases et à la diminution de la durée de vie des patients. Au contraire, il a été montré que l'expression de LC3 peut être associée à un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de cancer de l'hypopharynx et du rein en permettant d'augmenter la survie de ces patients (Deng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). L'étude de l'expression de LC3A a également permis de mettre en évidence qu'une forte expression de

cette protéine est associée à un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer des ovaires et des poumons (Karpathiou *et al.*, 2011; Spowart *et al.*, 2012).

Néanmoins, le rôle de LC3 dans le cancer ne semble pas dépendre uniquement du type de tumeur. En effet, dans le cancer de l'œsophage, Chen et collaborateurs ont mis en évidence qu'une faible expression de LC3 est associée à une meilleure survie des patients, tandis que Sakurai et collaborateurs ont montré que l'expression de LC3 est associée à une fonction suppresseur de tumeur (Chen *et al.*, 2013; Sakurai *et al.*, 2013). De façon similaire, dans les cancers du sein TN, He et collaborateurs ont démontré qu'une faible expression de LC3 est associée à une augmentation du risque de métastases tandis que Lefort et collaborateurs ont mis en évidence que LC3 est associée à un facteur de mauvais pronostic (He *et al.*, 2013; Lefort *et al.*, 2014). Des études supplémentaires semblent donc indispensables afin de mieux comprendre le rôle de LC3 ou son statut de biomarqueur dans le cancer.

4.2. Sous-famille GABARAP

Les membres de la sous-famille GABARAP ont également été associés au cancer. Il a été mis en évidence, au sein de notre laboratoire, que *GABARAP* est peu exprimé dans les tissus tumoraux (Nemos *et al.*, 2003). D'autres études ont également montré une perte d'expression de la protéine GABARAP dans les cellules de cancer du sein CAL51. De plus, la surexpression de GABARAP dans ces cellules conduit à une diminution des phénotypes cancéreux *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* (Klebig *et al.*, 2005). De manière similaire, une perte de l'expression du messager et de la protéine GABARAP a été observée dans des cellules de cancer de l'ovaire et du sein où la surexpression de cette protéine conduit à une diminution de la croissance cellulaire et de la migration (Rho *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle suppresseur de tumeur de GABARAP. Néanmoins, ceci ne semble pas être le cas pour l'ensemble des types de cancer. En effet, une augmentation de l'expression de *GABARAP* a été mise en évidence dans les adénomes et dans les cancers de la thyroïde comparativement aux tissus sains (Roberts *et al.*, 2009). Une faible expression de *GABARAP* est également associée à une diminution de la survie des patients atteints de neuroblastomes (Roberts *et al.*, 2004). De plus, la forte expression de GABARAP dans le cancer du côlon semble associée à une réduction de la durée de vie des patients (Miao *et al.*, 2010).

Au sein de notre laboratoire, il a été également mis en évidence une perte de l'expression de *GABARAPL1* dans différentes lignées tumorales (Nemos *et al.*, 2003). De plus, une forte expression de *GABARAPL1* est associée à un facteur de bon pronostic chez les patientes

atteintes de cancer du sein et la surexpression de la protéine GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 conduit à une diminution de la prolifération cellulaire (Berthier *et al.*, 2010). Zhang et collaborateurs ont confirmé que la surexpression de GABARAPL1 inhibe, *in vitro*, la prolifération des cellules MCF-7 et ont démontré que cette surexpression inhibe, *in vivo*, la croissance tumorale après injection à des souris *nude* (Zhang *et al.*, 2011). Cette étude a également suggéré que GABARAPL1 dégrade la protéine DVL2 (Dishevelled 2) par autophagie sélective conduisant ainsi à l'inhibition de la voie WNT, une voie impliquée dans le cancer. Récemment, une perte de l'expression du messenger et de la protéine GABARAPL1 a été mise en évidence dans les carcinomes hépatocellulaires comparativement aux tissus sains. Il a également été montré dans cette étude que la surexpression de GABARAPL1 conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire et qu'une forte expression de cette protéine est associée à un facteur de bon pronostic chez les patients (Liu *et al.*, 2014). L'étude de l'expression des protéines membres de la famille GABARAP dans les leucémies myéloïdes aiguës a montré une perte de l'expression de GABARAPL1 et GABARAPL2 mais pas de GABARAP (Brigger *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle suppresseur de tumeur des membres de la sous-famille GABARAP.

5. Autophagie dans les thérapies anti-cancéreuses

Il a été mis en évidence que de nombreux traitements anti-cancéreux affectent l'autophagie, principalement en induisant ce mécanisme (Levy & Thorburn, 2011). Ces traitements peuvent induire l'autophagie de manière directe en régulant des composants de la machinerie autophagique ou de manière indirecte. C'est le cas par exemple des inhibiteurs de mTOR tels que le Temsirolimus et l'Everolimus utilisés actuellement pour les cancers du sein et du rein, l'inhibiteur du protéasome Bortezomib utilisé dans les cas de myélome ou lymphome ou encore l'inhibiteur d'HDAC (Histone désacétylases) Vorinostat (Shao *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2010).

Néanmoins, comme lors du développement et de la progression tumorale, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle paradoxal de l'autophagie suite à ces traitements anti-cancéreux conduisant à une augmentation ou une diminution de leur efficacité (Nagelkerke *et al.*, 2015; Panda *et al.*, 2015) (**Figure 14**). En effet, l'autophagie peut être activée comme un mécanisme protecteur qui va permettre aux cellules cancéreuses de résister aux traitements

(Levy & Thorburn, 2011; Maycotte & Thorburn, 2011) (**Figure 14 ①**). D'un autre côté, l'autophagie peut avoir un rôle anti-tumoral en induisant la mort autophagique et/ou l'apoptose (**Figure 14 ②**).

Par exemple, il a été mis en évidence que l'inhibition de l'autophagie augmente la cytotoxicité du traitement anti-cancéreux Docetaxel (un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules), mais inhibe celle d'un autre traitement anti-cancéreux appelé Cisplatine (un alkylant de l'ADN) dans le cancer du sein, suggérant que le premier composé induit une autophagie pro-tumorale tandis que le second induit une autophagie anti-tumorale (Shen *et al.*, 2015). Il existe donc actuellement deux principales stratégies dans les thérapies anti-cancéreuses ciblant l'autophagie : inhiber l'autophagie protectrice ou induire la mort autophagique en association avec les traitements anti-cancéreux classiques.

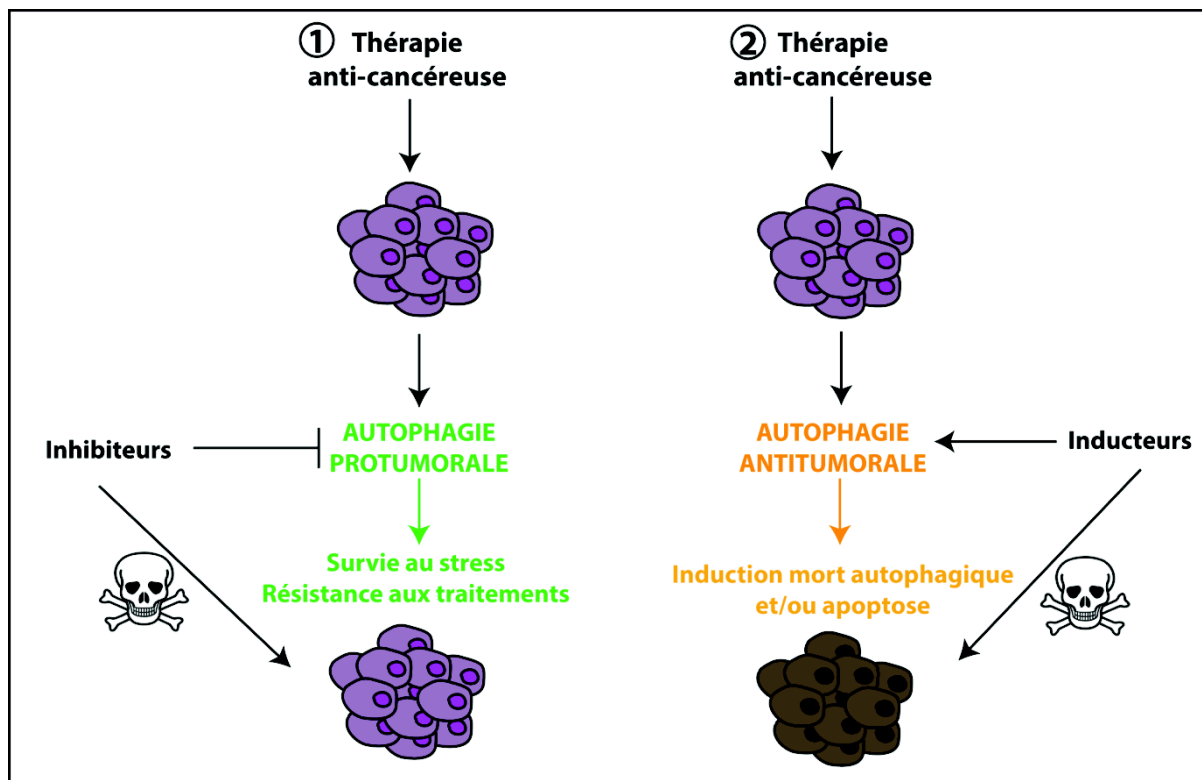



Figure 14 : Modulation de l'autophagie dans les thérapies anti-cancéreuses. De nombreuses thérapies conduisent à l'induction de l'autophagie dans les tumeurs. Deux scénarios sont possibles : ① L'autophagie peut conduire à la survie des cellules en leur permettant de résister aux traitements anti-cancéreux. L'inhibition de l'autophagie peut alors permettre de sensibiliser à nouveau les cellules aux traitements et conduire à leur mort cellulaire. ② Lors d'un stress prolongé, l'autophagie peut conduire à la mort des cellules cancéreuses par apoptose ou mort autophagique. Une induction supplémentaire de l'autophagie peut permettre d'augmenter la mort des cellules cancéreuses.

5.1. Traitements anti-cancéreux en association avec l'inhibition de l'autophagie

Des études ont mis en évidence que la résistance des tumeurs aux traitements anti-cancéreux tels que la radiothérapie et la chimiothérapie peut être due à l'induction de l'autophagie dans

ces tumeurs (Hu *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2012) (**Figure 14** ). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie en association avec des traitements anti-cancéreux semble une bonne stratégie afin d'augmenter la cytotoxicité de ces traitements. Plusieurs types d'inhibiteurs de l'autophagie peuvent être utilisés : par exemple le 3-MA (3-méthyladénine), la Wortmannine et le LY294002 qui inhibent les étapes précoces de l'autophagie en ciblant le complexe PI3KC3 ou la CQ (chloroquine), l'HCQ (hydroxychloroquine) et la BafA1 (bafilomycine A1) qui inhibent les étapes tardives de l'autophagie en ciblant la fusion autophagosome/lysosome.

Il a été mis en évidence par exemple que l'inhibition de l'autophagie par 3-MA augmente l'efficacité du cisplatine et du 5-FU (5-fluorouracil, un antinéoplasique) dans le cancer de l'œsophage et du colon, respectivement (Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). De plus, l'association de la CQ et du 5-FU permet la rémission complète dans un modèle de carcinome mammaire murin comparé à l'utilisation de ces composés seuls. Il a également été mis en évidence que l'utilisation de CQ en association avec le Vorinostat, le Bortezomib ou le 5-FU conduit à une diminution de la croissance tumorale et à l'induction de l'apoptose dans des modèles de cancer du côlon et du sein, de manière plus importante que les traitements anti-cancéreux seuls (Carew *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2009; Dupere-Richer *et al.*, 2013; Shoemaker, 1978). L'inhibition de l'autophagie dans des cellules de cancer du sein résistantes au Trastuzumab, un anticorps monoclonal recombinant ciblant HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), et au Tamoxifène (4-hydroxy-tamoxifène, un antiestrogène) permet de rendre ces cellules à nouveau sensibles aux traitements (Cufi *et al.*, 2013; Qadir *et al.*, 2008; Samaddar *et al.*, 2008; Vazquez-Martin *et al.*, 2009).

Néanmoins, le choix d'un inhibiteur de l'autophagie, agissant sur les étapes précoces ou tardives de ce mécanisme, est important puisque tous ne conduiront pas à une inhibition de la résistance des cellules lors de l'association à un traitement anti-cancéreux. Par exemple, le traitement anti-cancéreux FK866 induit une autophagie protectrice dans des cellules de neuroblastomes. L'ajout de CQ augmente la cytotoxicité de ce composé tandis que le 3-MA réduit cette cytotoxicité (Travelli *et al.*, 2011). Il a également été montré dans des cellules de gliome que la cytotoxicité induite par l'imatinib (un inhibiteur des tyrosines kinases) ou le témozolomide (un alkylant de l'ADN) est réduite par addition de 3-MA et augmentée par addition de BafA1 (Kanzawa *et al.*, 2004; Shingu *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont également été obtenus dans le cas de leucémie myéloïde chronique, de cancer du côlon et du foie (Adisheshaiah *et al.*, 2013; Schafranek *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données suggère que l'inhibition des stades tardifs de l'autophagie (CQ ou BafA1) est plus efficace pour

augmenter la cytotoxicité des traitements anti-cancéreux que l'inhibition des stades précoces (3-MA).

5.2. Traitements anti-cancéreux en association avec l'induction de la mort autophagique

Un stress prolongé peut induire une autophagie excessive qui va empêcher la survie des cellules les forçant à entrer en mort autophagique. Ce stress prolongé peut également conduire à l'apoptose en association ou non à la mort autophagique (Panda *et al.*, 2015) (**Figure 14** ). La mort autophagique diffère de l'apoptose puisqu'elle est associée à une augmentation du nombre d'autophagosomes et est indépendante des caspases. Différents traitements anti-cancéreux tels que le Tamoxifène, les inhibiteurs des topoisomérase de classe II, l'Amsacrine (un inhibiteur de la synthèse d'ADN), le Témazolomide, les cannabinoïdes (un activateur des récepteurs cannabinoïdes) et le Trioxyde d'arsenic (un inhibiteur de la prolifération cellulaire) induisent la mort des cellules cancéreuses par le biais de l'autophagie (Bursch *et al.*, 1996; Kanzawa *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2003; Kanzawa *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2012). De façon similaire, il a été mis en évidence que le traitement anti-cancéreux STF-62247 induit l'autophagie et conduit à la mort des cellules de cancer du rein. L'inhibition de l'autophagie dans ces cellules conduit à une perte de la sensibilité au traitement (Turcotte *et al.*, 2008). Il a également été mis en évidence que certains traitements utilisés dans d'autres pathologies tels que la Metformine, un anti-diabétique, peuvent également induire la mort autophagique dans les cellules cancéreuses (Takahashi *et al.*, 2014). De nombreuses voies de signalisation activées dans le cancer régulent l'autophagie, il a été montré que les inhibiteurs de ces voies de signalisation peuvent inhiber la croissance tumorale *via* la mort autophagique. C'est le cas par exemple de l'Imatinib qui induit la mort autophagique des cellules de gliome (Shingu *et al.*, 2009). Les inhibiteurs d'histones désacétylases tels que le SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) induisent la mort autophagique dans le cancer du col de l'utérus mais également dans les carcinomes hépatocellulaires où ils inhibent la voie mTOR et induisent la réponse UPR (Liu *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2004).

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements, des inducteurs de l'autophagie peuvent être utilisés en association avec des traitements anti-cancéreux augmentant ainsi la mort autophagique, l'apoptose et la sensibilité des cellules résistantes. Par exemple, l'association de la Rapamycine, un inhibiteur de mTOR et inducteur de l'autophagie, à la radiothérapie conduit à une augmentation de la mort des cellules de cancer du sein et à une sensibilisation des

carcinomes hépatocellulaires résistants à ce traitement (Kuwahara *et al.*, 2011; Paglin *et al.*, 2005). De la même manière, l'association de RAD001, un dérivé de la rapamycine, à la radiothérapie conduit à la sensibilisation des cellules de cancer du sein et de la prostate (Albert *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2006). L'inhibition de mTOR en association avec la radiothérapie induit également la sénescence dans les cellules cancéreuses et les xénogreffes (Nam *et al.*, 2013). Il a également été mis en évidence que l'association de RAD001 aux traitements de chimiothérapie témolozomide conduit à une augmentation de la cytotoxicité suite à l'induction de la mort autophagique (Josset *et al.*, 2013).

5.3. Théranostique

Toutes ces études mettent en évidence la complexité du choix d'un traitement adapté à chaque patient ou à chaque type de tumeur. Ces observations ont amené les chercheurs à développer un autre type de thérapie appelée théranostique ou médecine personnalisée qui consiste à adapter la thérapie au contexte génétique et biochimique de chaque patient liant ainsi diagnostic et thérapie. Cette approche est basée sur le développement de nouveaux protocoles de diagnostic qui ciblent de nouveaux biomarqueurs spécifiques permettant l'utilisation d'une thérapie ciblée.

Néanmoins, il est difficile de savoir s'il est plus judicieux d'activer ou d'inhiber l'autophagie chez les patients. En effet, le problème majeur est de pouvoir mesurer avec précision le taux d'autophagie dans la tumeur *in vivo* afin d'adapter au mieux le traitement. Or, l'autophagie est un processus dynamique dans lequel les autophagosomes marqués par LC3-II sont formés puis dégradés et recyclés. Une augmentation de LC3-II peut donc être associée à une augmentation ou une diminution de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2012). De nombreuses techniques existent aujourd'hui pour étudier ce processus *in vitro* mais nous possédons actuellement très peu de techniques nous permettant de l'évaluer *in vivo* chez l'homme. Afin d'étudier le flux autophagique, il est nécessaire de comparer le taux de LC3-II en présence et en absence d'un inhibiteur de l'autophagie, ce qui n'est pas réalisable chez un patient rendant ainsi difficile l'analyse de l'autophagie. Il est donc indispensable actuellement de trouver de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles techniques pour étudier le flux autophagique *in vivo* et permettre ainsi le développement de traitements adaptés à chaque patient.

MATERIELS ET METHODES

Cette partie « Matériels et méthodes » regroupe les protocoles des expériences que j'ai pu réaliser au cours de ma thèse. Les protocoles des expériences réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr. Jianhua Zhang (Birmingham, AL, USA) ne sont pas décrits ici.

I. CULTURE CELLULAIRE

1. Lignées cellulaires utilisées

Les lignées MDA-MB-231 (*MD Anderson Hospital-Bruce Mackay*), MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation*) et MDA-MB-436 sont des lignées cellulaires humaines dérivées de cancer de sein. Les MEF (*Mouse embryonic fibroblast*) sont des fibroblastes embryonnaires de souris.

1.1. MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 et MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2.

La lignée MDA-MB-231 exprime la protéine QSOX1-S à un niveau élevé contrairement à la lignée MCF-7 qui ne l'exprime pas. La lignée MDA-MB-231 a donc été utilisée comme modèle d'extinction de QSOX1 et la lignée MCF-7 comme modèle de surexpression de cette protéine.

Les lignées cellulaires shQSOX1-1 et shQSOX1-2 dans lesquelles l'expression de QSOX1 est éteinte et la lignée contrôle shC résultent de la transfection des cellules MDA-MB-231 par des vecteurs de type shRNA (TRCN0000064183, TRCN0000064185 et SHGLYNM_001004128 respectivement, Sigma Aldrich). Ces cellules présentent une résistance à la puromycine (1 µg/ml).

Les lignées cellulaires hQSOX1S-1 et hQSOX1S-2 dans lesquelles la protéine QSOX1-S est surexprimée et la lignée contrôle Ctrl résultent de la transfection des cellules MCF-7 par des plasmides d'expression de QSOX1-S. Le plasmide d'expression de QSOX1-S (pcDNA3.1-QSOX1S) a été construit par insertion de la séquence codante du variant 2 d'épissage QSOX1-S (AF361868) entre les sites *EcoRV* et *BamHI* du plasmide pcDNATM3.1/Hygro (-) (Invitrogen). Ces cellules présentent une résistance à l'hygromycine (100 µg/ml). L'extinction et la surexpression de QSOX1 dans les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 ont été validées précédemment au laboratoire (**Figure 15**) (Pernodet *et al.*, 2012).

Les cellules MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 et MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 ont été cultivées en milieu complet DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 1% de L-glutamine et additionné de 5% de SVF (Sérum de Veau Foetal), d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine) et d'antifongique (Amphotericin B 0,23 U/mL).

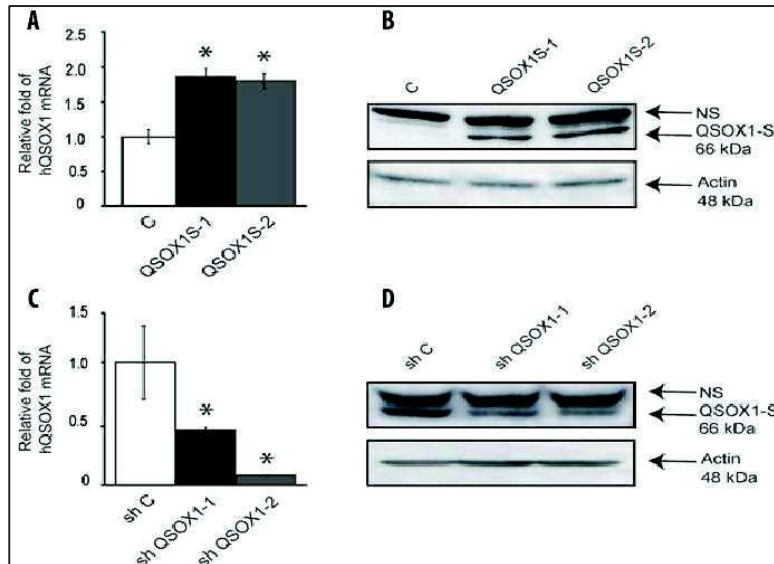


Figure 15 : Validation de l'extinction de QSOX1 ou de la surexpression de QSOX1-S dans les lignées MDA-MB-231 et MCF-7. (D'après Pernodet *et al.*, 2012) Etude de l'expression du messenger et de la protéine QSOX1 dans les lignées MCF-7 (A, B) et les lignées MDA-MB-231 (C, D). (A) et (C) Quantification par RT-qPCR des ARNm QSOX1. (B) et (D) Analyse par western-blotting de l'expression de QSOX1-S.

1.2. MDA-MB-436 shC, sh2, sh5 et MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 et c2

La lignée MDA-MB-436 qui exprime la protéine GABARAPL1 de manière endogène a servi de modèle d'extinction de cette protéine contrairement à la lignée MCF-7 qui exprime très peu GABARAPL1 et représente donc un bon modèle de surexpression.

Dans la lignée MDA-MB-436, 5 clones d'extinction (sh1 à sh5) de GABARAPL1 ont été précédemment obtenus au laboratoire. Les clones sh2 et sh5 présentant les plus forts taux d'extinction ont été sélectionnés pour la suite des expériences. Les lignées sh2 et sh5 et la lignée contrôle shC résultent de la transfection des cellules MDA-MB-436 par des vecteurs de type shRNA (SHCLNG-NM_031412, shRNA443s1c1 pour pKo.1-puro-shRNA GABARAPL1 et SHC002 pour pKo.1-puro-shRNA-control vector, Sigma Aldrich). Les cellules MDA-MB-436 shC, sh2, sh5 présentent une résistance à la puromycine (1 µg/ml).

Les lignées cellulaires GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 et c2 dans lesquelles la protéine GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A est surexprimée et la lignée contrôle C résultent de la transfection des cellules MCF-7 par les plasmides pcDNA3.1-FLAG-

GABARAPL1-6HIS, pcDNA3.1-FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS ou pcDNA3.1 vide, respectivement. Ces cellules présentent une résistance à l'hygromycine (100 µg/ml).

Les cellules MDA-MB-436 shC, sh2, sh5 et MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 et c2 ont été cultivées en milieu complet DMEM contenant 1% de L-glutamine et additionné de 10% de SVF, d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine) et d'antifongique (Amphotericin B 0,23 U/mL).

1.3. MEFi ou MEFt WT, GABARAP-/- et GABARAPL1

Les cellules fibroblastiques embryonnaires (embryon à J14) MEFi GABARAP -/- ont été obtenues à partir de cellules de souris Knock-out 129/SvEv-C57BL/6 fournies par le Pr. Heinrich Betz (Max Planck institute for Brain research, Allemagne) immortalisées par transfection stable de l'antigène grand T de SV40 (Simian virus 40).

Les lignées transformées MEFt WT et MEFt GABARAP -/- surexprimant l'oncoprotéine HRAS^{G12V} mutée ont été établies par transfection stable des cellules MEFi WT et MEFi GABARAP -/- par le vecteur pBABE-HRAS-V12-puro. En parallèle, des lignées contrôle ont été obtenues après transfection stable des cellules MEFi WT et MEFi GABARAP -/- par le plasmide pBABE vide. La sélection des clones stables a été effectuée en présence de 3 µg/ml de puromycine puis les clones positifs ont été maintenus dans du milieu complet additionné de 3 µg/ml de puromycine. Les lignées MEFi surexprimant la protéine de fusion GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A ont été établies par transfection stable des cellules MEFi par le vecteur pcDNA3.1-FLAG-GABARAPL1-6HIS ou pcDNA3.1-FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS. La sélection des clones stables a été effectuée en présence de 200 µg/ml d'hygromycine puis les clones positifs ont été maintenus dans du milieu complet additionné de 100 µg/ml d'hygromycine.

Les cellules MEF ont été cultivées en milieu complet DMEM contenant 1% de L-glutamine et additionné de 10% de SVF, d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine) et d'antifongique (Amphotericin B 0,23 U/mL).

2. Entretien des cellules

Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ et sous-cultivées deux fois par semaine. Pour cela, le surnageant de culture a été éliminé et remplacé par 5 mL

de Hank's-EDTA 0,03%. Après élimination du Hank's-EDTA 0,03%, les cellules ont été incubées avec 1,5 mL de trypsine-EDTA 1X et placées à 37°C pendant 5 min. La trypsine a ensuite été inactivée par ajout de 8,5 mL de milieu complet. La suspension cellulaire a été prélevée et centrifugée pendant 5 min à 600 g. Le culot cellulaire a été repris dans 10 mL de milieu complet et la quantité de cellules nécessaire a étéensemencée dans 10 mL de milieu complet dans une nouvelle boîte.

3. Congélation et décongélation

Pour la congélation, des cellules en phase exponentielle de croissance (environ 60% de confluence) ont été trypsinées, reprises dans 10 mL de milieu complet puis centrifugées pendant 5 min à 600 g. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 1 mL de solution de congélation (90% milieu complet et 10% de DMSO). La suspension cellulaire a été congelée progressivement dans un récipient contenant de l'isopropanol pendant une nuit à -80°C, puis plongée dans l'azote liquide à -196°C pour un stockage des cellules de longue durée.

Pour la décongélation, les cryotubes ont été placés à 37°C dès la sortie de l'azote liquide. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans 10 mL de milieu complet et centrifugée pendant 5 min à 600 g. Le culot est remis en suspension dans 10 mL de milieu complet puis placé dans une boîte de culture de 75 cm². Le lendemain, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par 10 mL de milieu complet.

4. Transfection cellulaire

4.1. Transfection stable

Pour l'obtention des cellules MEFi surexprimant GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A :
Les cellules MEFi ont étéensemencées dans des boîtes de 10 cm de diamètre à raison de 500 000 cellules par boîte. Une linéarisation du vecteur pcDNA3.1 vide ou exprimant FLAG-GABARAPL1-6HIS ou FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS a été réalisée par *Bgl II* pendant 1 heure à 37°C. Suite à une inactivation de l'enzyme avec 20 mM d'EDTA, les cellules MEFi WT ont été transfectées avec 500 ng du vecteur linéarisé. Pour cela, le vecteur a été incubé avec l'agent de transfection Jet Prime (Jet Prime, Polyplus Transfection) dans 250 µl de tampon (Jet Prime buffer) pendant 10 min à température ambiante. Ce volume a été ajouté au milieu de culture des cellules à transfecter et une incubation de 24 heures à 37°C et 5 % CO₂ a été réalisée.

Après 24 heures, les cellules ont été trypsinées puisensemencées dans deux nouvelles boîtes de 10 cm de diamètre à dilution 1/2. Les cellules ont été sélectionnées dans du milieu complet contenant l'antibiotique de sélection jusqu'à l'apparition de clones stables.

Pour l'obtention des cellules MEFt WT et GABARAP^{-/-} : Les cellules MEFi WT et MEFi GABARAP^{-/-} ont été transfectées avec 500 ng du vecteur pBABE-HRAS-V12-puro (Debnath *et al.*, 2003) non linéarisé. Le vecteur a été incubé avec l'agent de transfection Jet Prime (Jet Prime, Polyplus Transfection) dans 250 µl de tampon (Jet Prime buffer) pendant 10 min à température ambiante. Ce volume a été ajouté au milieu de culture des cellules à transfecter et une incubation de 24 heures à 37°C et 5 % CO₂ a été réalisée. Après 24 heures, les cellules ont été trypsinées puisensemencées dans deux nouvelles boîtes de 10 cm de diamètre à dilution 1/2. Les cellules ont été sélectionnées dans du milieu complet contenant l'antibiotique de sélection jusqu'à l'apparition de clones stables.

4.2. Transfection transitoire

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques 24 puits à raison de 2 x 10⁵ cellules par puit (pour l'analyse en microscopie confocale). Le jour suivant, les cellules ont été transfectées avec 0,5 µg de vecteur, 50 µl de tampon Jetprime et 1 µl de Jetprime (Polyplus Transfection) selon les recommandations du fournisseur. Après 4h d'incubation à 37°C avec les complexes ADN-Jetprime, le milieu de transfection a été remplacé par 500 µl de milieu complet puis les cellules ont été de nouveau placées à 37°C pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées et analysées en microscopie confocale (Olympus FluoView FV1000). Le vecteur pGFP-LC3 a été obtenu auprès du laboratoire du Dr. Zvunlun Elazar (Weizmann Institute, Israël). Le vecteur ptf-LC3 (pGFP-RFP-LC3) et le vecteur HA-p62 ont été achetés auprès d'Addgene (137624 et 28027, respectivement).

Pour les expériences de western-blotting, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 600 000 cellules par puit, transfectées le jour suivant puis récoltées 24 h après la transfection.

5. Traitement chimique des cellules

L'autophagie est un processus dynamique lors duquel les autophagosomes sont produits puis dégradés suite à leur fusion avec les lysosomes. Pendant l'autophagie, la protéine LC3 est clivée

et liée à un phospholipide au niveau des autophagosomes pour donner la forme associée à la membrane LC3-II. Le taux de cette protéine est donc directement corrélé au nombre d'autophagosomes. Néanmoins, le taux de protéine LC3-II n'est pas directement corrélé au flux autophagique global mais représente l'autophagie à un moment donné. Une augmentation de LC3-II peut ainsi rendre compte d'une augmentation de flux autophagique ou d'une diminution de la dégradation des autophagolysosomes. Afin d'étudier le flux autophagique, il est donc nécessaire d'utiliser des inhibiteurs de ce mécanisme. Les concentrations de chaque composé utilisé ainsi que la durée des traitements sont décrits dans le *Tableau 1*.

Pour induire l'autophagie, nous avons utilisé plusieurs composés : l'EBSS (Earle's balanced salt solution, Sigma Aldrich) ou la rapamycine (Sigma Aldrich). L'EBSS est une solution saline dépourvue de nutriments qui conduit à une carence nutritionnelle et induit donc l'autophagie. La rapamycine inhibe l'activité de la kinase mTOR qui est un inhibiteur connu de l'autophagie.

Pour inhiber l'autophagie, nous avons utilisé des inhibiteurs des étapes précoces de l'autophagie : 3-MA (Sigma Aldrich) et wortmannine (Sigma Aldrich) et des inhibiteurs des étapes tardives de l'autophagie : BafA1 (Sigma Aldrich), CQ (Sigma Aldrich) et NH₄Cl (Chlorure d'ammonium, Sigma Aldrich). Le 3-MA et la wortmannine inhibent le complexe PI3K responsable de l'initiation de l'autophagie. La BafA1 bloque les pompes V-ATPase conduisant à une inhibition de la fusion autophagosome/lysosome. La CQ et le NH₄Cl sont des agents lysosomotropiques qui inhibent les enzymes lysosomales en augmentant le pH intralysosomal ce qui aboutit également à une inhibition de la fusion autophagosome/lysosome.

Nous avons également utilisé un inhibiteur du protéasome, le MG132, qui inhibe l'activité protéolytique du complexe 9 du protéasome.

Composé	Utilisation	Temps (h)
3-MA	10 mM	24
BafA1	100 nM	2
CQ	40 µM	2
EBSS	/	4 à 8
MG132	2 µM	15
NH₄Cl	50 mM	2
Rapamycine	10 µM	4
Wortmannine	100 nM	24

Tableau 1 : Concentrations et durées des traitements utilisés

II. ANALYSE DES PROTEINES

1. Extraction des protéines

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

- 1) Les cellules MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 et MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 ont été collectées mécaniquement à l'aide d'un grattoir puis centrifugées (5 min, 260g) et lavées dans la solution saline de Hank's. Les culots cellulaires ont ensuite été repris dans 50 µL de tampon RIPA [Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, Triton X-100 1% (v/v), NaDOC 0,5% (p/v), SDS 0,1% (p/v)] additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich) puis incubés 20 min sur glace. Les échantillons ont été centrifugés (20 min, 14 000g, 4°C) afin de récupérer le surnageant. La concentration en protéines du surnageant a été ensuite déterminée par la méthode de Lowry puis l'extrait protéique a été dilué dans du tampon de charge [Tris-HCl 300 mM pH 6,8, glycérol 50% (v/v), SDS 10% (p/v), β-mercaptoéthanol 25% (v/v), bleu de bromophénol 0,1% (p/v)] avant conservation à -80°C.
- 2) Les cellules MDA-MB-436 shC, sh2, sh5 et MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 et c2 ont été lysées par ajout de volume adéquat de tampon de charge 1X [Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glycérol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β-mercaptoéthanol 5% (v/v), bleu de bromophénol 0,02% (p/v)]. Les extraits protéiques ont ensuite été soniqués pendant 10s (Sonics and Materials, USA) puis congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.
- 3) Les cellules MEFi et MEFt ont été collectées mécaniquement à l'aide d'un grattoir puis centrifugées (5 min, 260g) et lavées dans la solution saline de Hank's. Les culots cellulaires ont ensuite été repris dans 50 µL de tampon de lyse composé de 50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glycérol, 1mM MgCl₂, 1 mM EGTA, inhibiteur de phosphatases (1 mM Na₃VO₄ et 10 mM NaF), additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich), 1 mM de PMSF, puis incubés 20 min sur glace. Les échantillons ont été centrifugés (20 min, 14 000g, 4°C) afin de récupérer le surnageant. La concentration en protéines du surnageant a été ensuite déterminée par la méthode de Lowry puis l'extrait protéique a été dilué dans du tampon de charge [Tris-HCl 300 mM pH 6,8, glycérol 50% (v/v), SDS 10% (p/v), β-mercaptoéthanol 25% (v/v), bleu de bromophénol 0,1% (p/v)] avant conservation à -80°C.

2. Western blotting et révélation

Les échantillons protéiques ont été dénaturés 5 min à 95°C avant d'être chargés sur un gel SDS-PAGE (composé d'un gel de séparation 10% ou 12,5% et un gel de concentration 4%) (Système Mini Protean Gel III, BioRad). La migration a été effectuée dans un tampon d'électrophorèse [Tris-HCl 25 mM pH8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1% (v/v)] à 10 mA par gel pendant 30 min puis à 20 mA par gel pendant environ 1h.

Après migration, les protéines ont été transférées du gel sur une membrane PVDF (BioRad) dans du tampon de transfert [Tris-HCl 25 mM pH8,3, glycine 192 mM, méthanol 10% (v/v)] à 200 mA durant 2h et à froid (Système Mini Trans Blot, BioRad). Les sites de fixation non spécifiques ont été saturés dans un tampon TBS-T [Tris-HCl 199 mM pH7,4, NaCl 0,35 M, Tween 20 0,1% (v/v)] supplémenté de 5% Régilait durant 1h à température ambiante et sous agitation.

Anticorps	Espèces	Dilution	Fournisseur
PRIMAIRES			
p62 (SQTM1)	souris	1/1500 ^e	Santa Cruz, sc-28359
LC3	lapin	1/3000 ^e	Sigma, L8918
QSOX1	lapin	1/7500 ^e	Pr Esnard (Tours)
Actine	lapin	1/1500	Sigma, A5060
GABARAPL1	lapin	1/2000 ^e	Chemicon Millipore, AB15278
GABARAPL1	lapin	1/1000 ^e	Proteintech, 11010-1-AP
LAMP1	souris	1/1000 ^e	Abcam, AB25630
mTOR	lapin	1/1000 ^e	Cell signaling, #2983
Phospho-mTOR	lapin	1/1000 ^e	Cell signaling, #2974
P70S6 kinase	Lapin	1/1000 ^e	Cell signaling, #9202
Phospho-p70S6 kinase	Lapin	1/1000 ^e	Cell signaling, #9205
Phospho-ULK1 S555	lapin	1/1000 ^e	Cell signaling, #5869
SV40	souris	1/2000 ^e	Abcam, AB16879
HRas	lapin	1/500 ^e	Santa Cruz, sc-520
SECONDAIRES			
Anti IgG de souris HRP conjugué	chèvre	1/10000 ^e	Paris Anticorps, BI2413C
Anti IgG de lapin HRP conjugué	chèvre	1/10000 ^e	Paris Anticorps, BI2407

Tableau 2 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines par Western-Blotting

Les membranes ont été incubées une nuit, sous agitation, avec l'anticorps primaire approprié (**Tableau 2**) dans la solution de saturation. Suite à trois lavages de 10 min dans la solution de lavage TBS-T, les membranes ont été incubées pendant 1h, avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation (**Tableau 2**). Après trois lavages de 10 min dans la solution de lavage TBS-T, les protéines ont été révélées par chimioluminescence. Pour cela, les membranes ont été recouvertes par 1 mL de réactif PCA-ECL (Tris-HCl 100 mM pH 8,8, luminol 2,5 mM, 0,2 mM pCA, 2,6 mM hydrogenperoxide) puis analysées à l'aide du Chemidoc XRS+ (Biorad).

3. Marquage des cellules et microscopie confocale

3.1. Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle dans des plaques 24 puits à raison de 2×10^5 cellules par puit. Le jour suivant, les cellules ont été stimulées ou non puis rincées 2 fois 5 min au PBS froid et fixées pendant 15 min au PFA 4% (p/v). Après lavage rapide au PBS 1X, les cellules ont été perméabilisées pendant 5 min au PBS-Triton 0,1% (v/v) et rincées rapidement puis 5 min au PBS 1X. Les sites aspécifiques ont ensuite été saturés pendant 45 min avec une solution de PBS-BSA 5%. Les cellules ont été incubées une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS-BSA 1% (**Tableau 3**).

Anticorps	Espèces	Dilution	Fournisseur
PRIMAIRES			
p62 (SQSTM1)	souris	1/250 ^e	Santa Cruz, sc-28359
GABARAPL1	lapin	1/100 ^e	Proteintech, 11010-1-AP
LAMP1	souris	1/100 ^e	Abcam, AB25630
SECONDAIRES			
Anti IgG de souris Alexa fluor 555	chèvre	1/800 ^e	Life technologies, A-21422
Anti IgG de lapin Alexa fluor 488	chèvre	1/800 ^e	Life technologies, A-11008

Tableau 3 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines par immunofluorescence

Le lendemain, les cellules ont été lavées rapidement puis pendant 5 min au PBS 1X avant d'être incubées en présence de l'anticorps secondaire dilué dans la solution de PBS-BSA 1% pendant 1h (**Tableau 3**). L'ADN du noyau des cellules est ensuite marqué au DAPI (AAT Bioquest). Les cellules ont été rincées pendant 5 min au PBS 1X, montées sur lame à l'aide du milieu de montage Vectashield Hardset (Vector Laboratories) et observées au microscope.

3.2. Marquage au Lysotracker et Mitotracker

Le Lysotracker permet un marquage des vésicules acides et en particulier des lysosomes tandis que le Mitotracker permet un marquage des mitochondries. Les cellules ont étéensemencées sur lamelle dans des plaques 24 puits à raison de 2×10^5 cellules par puit. Le jour suivant, les cellules ont été traitées par 500 nM de Lysotracker red (Lysotracker Red Dnd-99, Invitrogen) pendant 1h. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois 10 min au PBS 1X froid et fixées au PFA 4% pendant 15 min. Les cellules ont été à nouveau rincées au PBS puis montées sur lame à l'aide du milieu de montage Vectashield Hardset et observées au microscope confocal à une longueur d'onde d'excitation de 577 nm et d'émission de 590 nm.

Afin d'étudier les lysosomes et mitochondries sur cellules vivantes, les cellules ont étéensemencées à raison de $2,8 \times 10^5$ cellules par puit dans des chambres Lab-Tek (Nunc, 155380). Le jour suivant, le milieu de culture a été éliminé puis remplacé par du milieu complet frais contenant 100 nM de Lysotracker green (Lysotracker Green Dnd-26, Invitrogen) et 50 nM Mitotracker red (Mitotracker Red CMX-ROS, Invitrogen). Les cellules ont ensuite été placées à 37°C pendant 45 min puis observées par microscopie confocale à une longueur d'onde d'excitation de 504 nm et une longueur d'onde d'émission de 511 nm (pour le Lysotracker) et à une longueur d'onde d'excitation de 579 nm et une longueur d'onde d'émission de 599 nm (pour le Mitotracker).

4. Cytométrie en flux

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 2×10^5 cellules par puit. Le jour suivant, les cellules ont été traitées par 50 nM de Lysotracker red (Lysotracker Green Dnd-99, Invitrogen) pour l'étude des lysosomes ou par du MagicRed selon les recommandations du fournisseur (Immunochemistry technology) pour l'étude de l'activité des cathepsines B. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 45 min à 37°C, récoltées à l'aide de trypsine, resuspendues dans du milieu complet et centrifugées à 600g pendant 5 min. Les cellules ont été ensuite reprises dans 500 μ l de PBS 1X et soumises à une nouvelle centrifugation avant d'être remises en suspension dans 250 μ l de PBS 1X. L'intensité de fluorescence a ensuite été analysée par cytométrie en flux sur 10000 évènements (FC500 Beckman Coulter).

III. ANALYSE DES ARN TOTAUX

1. Extraction des ARN totaux

Dans le but d'extraire les ARN totaux, 600 000 cellules ont été lavées par une solution saline de Hank's. Les cellules ont ensuite été lysées par ajout de 1 mL de tampon de lyse (TRIzol Reagent, Invitrogen). Les ARN ont été extraits par l'ajout de 200 µl de chloroforme, suivi d'une centrifugation (10 min, 12 000g, 4°C). Les ARN contenus ont ensuite été précipités par l'addition d'un volume d'isopropanol froid suivie d'une incubation de 10 min à température ambiante et d'une centrifugation (10 min, 12 000g, 4°C). Le culot a été lavé par 1 mL d'éthanol 70% avant d'être dissout dans 20 µl d'eau ultra pure stérile.

Afin d'éliminer toutes traces d'ADN, les échantillons d'ARN ont été traités par 1 U/µl de DNase I pendant 30 min à 37°C (Fermentas). L'activité de la DNase I a été stoppée par ajout d'EDTA 1 mM suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min. Les échantillons ont ensuite été purifiés par addition de ¼ de volume de phénol acide suivie d'une incubation de 5 min sur glace et d'une centrifugation (15 min, 12 000g, 4°C). Les échantillons ont été quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Transcription inverse (RT)

Suite à l'extraction des ARN totaux, les ARNm ont été soumis à une transcription inverse. Pour ce faire, 2 µg d'ARN totaux, 1 µM d'amorce oligodT(17) et 1 mM de dNTP dans un volume final de 10 µL ont été incubés à 70°C durant 10 min puis rapidement placés sur glace. Le tampon de l'enzyme et 100 U de transcriptase inverse (M-MLV Reverse Transcriptase, Sigma) ont ensuite été ajoutés dans un volume final de 20 µl. Ce mélange réactionnel a été placé 10 min à température ambiante puis 50 min à 37°C. L'enzyme a été inactivée par chauffage 10 min à 87°C. Les ADNc ainsi obtenus ont pu être analysés par PCR semi-quantitative ou en temps réel.

3. Analyse par RT-PCR semi-quantitative

Brièvement, les réactions PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µl en présence de : 200 µM de dNTP, 2 µM de chaque amorce (**Tableau 4**), 8 µl d'ADNc dilués au 1/80, du tampon 1X DreamTaq (Euromedex) et 1 U de DreamTaq polymérase (Euromedex). La PCR est réalisée dans un thermocycleur T100 (Biorad), d'après le protocole suivant : 5 min de

dénaturation initiale à 94°C suivie de 35 cycles composés d'une étape de dénaturation pendant 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation pendant 30 sec à 56°C et une étape d'élongation pendant 1 min à 72°C. La PCR se termine par une élongation finale pendant 10 min à 72°C.

Ensuite 10 µl du produit de PCR ont été déposés dans un gel d'agarose 1,2 %, l'ADN a été séparé à 50 V pendant 10 min dans un tampon TAE 0,5x (40 mM Tris-acétate pH 8,1 mM EDTA), puis à 100 V pendant 30 min. L'ADN a été révélé par un bain de 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET) (0,5 µg/ml). Le marqueur de taille utilisé est le 1kb DNA Ladder Plus (Invitrogen).

Amorces	Séquences
<i>60 Asens BAMH1 (GABARAPL1)</i>	<i>CGCGGATCCGCCTTTCCCATAGACTCTC</i>
<i>T7 sens (GABARAPL1)</i>	<i>TAAATACGACTCACTATAGGG</i>
<i>HRas-V12 sens (HRas)</i>	<i>TACACGTTGGTGCGTGAGAT</i>
<i>pBABE3 rev (HRas)</i>	<i>ACCCTAACTGACACACATTCC</i>

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR semi-quantitative

4. Analyse par RT-PCR en temps réel

Les ADNc ont été amplifiés par PCR en temps réel (q-PCR) grâce à la méthode du Syber Green (Applied Biosystem). A 10 µl du mélange Power SYBR Green PCR Master Mix 2X ont été ajoutés 1 µl de chaque amorce sens et anti-sens (**Tableau 5**) à une concentration initiale de 10 µM et 8 µl de matrice diluée au 1/80 ou 8 µl d'eau pour les témoins négatifs, dans un volume final de 20 µl.

Le programme d'amplification appliqué sur l'appareil de PCR en temps réel « StepOne » (Applied Biosystems) a été le suivant : dénaturation initiale et activation de la polymérase à 95°C pendant 10 min et amplification à 95°C pendant 15 sec puis 60°C pendant 1 min (40 cycles).

ADNc	Amorces	Séquences
hQSOX1 endogène	<i>p85s</i>	<i>GACCTGACGAGTTGGT</i>
	<i>p85r</i>	<i>AATCAAGCATGTGTAAGGCAC</i>
H3B2	<i>His-I</i>	<i>GCTAGCTGGATGTCTTTTGG</i>
	<i>His-N</i>	<i>GTGGTAAAGCACCCAGGAA</i>
P62	<i>p62_F_Hs</i>	<i>ATCGGAGGATCCGAGTGT</i>
	<i>p62_R_Hs</i>	<i>TGGCTGTGAGCTGCTCTT</i>
LC3	<i>LC3B-F2</i>	<i>CGGAAAGCAGCAGTGTACCA</i>
	<i>LC3B-R2</i>	<i>GGCAGAAGGGAGTGTGTCTGA</i>

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitative en temps réel.

IV. ETUDE DES PHENOTYPES CANCEREUX *IN VITRO*

1. Test de prolifération cellulaire : Test MTT

Le principe du test MTT est basé sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Tandis que le MTT est de couleur jaune, les cristaux de formazan, produits de la réaction, sont de couleur bleue. L'intensité de la coloration bleue est fonction de la proportion de cellules vivantes.

Les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits à raison de $1,5 \times 10^3$ cellules par puit pour les cellules MCF-7, 500 cellules par puits pour les cellules MDA-MB-231 et 300 cellules par puit pour les cellules MEF. Le jour suivant, le milieu a été éliminé et les cellules ont été placées en présence de MTT à 100 mM dans la solution saline de Hank's, à raison de 100 μ L par puit. Après 2h d'incubation à 37°C, les plaques ont été centrifugées (5 min, 300g) et le MTT a été éliminé en retournant vivement la plaque sur du papier absorbant. Afin de solubiliser les cristaux de formazan, 50 μ l de DMSO ont été ajoutés dans chaque puit. La quantité de cellules vivantes a alors été estimée par la mesure de l'absorbance à 549 nm et 620 nm en utilisant un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Multiskan FC, ThermoScientific).

2. Test de prolifération clonale

2.1. Test de capacité clonogénique

Les cellules ont étéensemencées en plaques 6 puits à raison de 500, 1000 et 2000 cellules par puit. Après 14 jours de culture, les colonies formées ont été fixées pendant 10 min par 1 mL d'éthanol absolu puis colorées pendant 10 min par une solution de cristal violet [cristal violet 0,5% (p/v), éthanol 2% (v/v)]. L'excès de colorant a été éliminé par trois lavages avec de l'eau distillée. Les colonies formées ont été photographiées à l'aide du Chemidoc XRS+ (Biorad) et analysées à l'aide du logiciel Bio-Capt.

2.2. 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 a été déposée dans les boîtes. Les cultures ont été 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 ont été réalisées de manière aléatoire. Les colonies de taille supérieure ou égale à 100 µm de diamètre ont été alors comptabilisées.

3. Test d'invasion cellulaire en chambre de Boyden modifié

L'étude de l'invasion cellulaire a été effectuée dans des chambres de Boyden modifiées (SPL Life Sciences, diamètre de 6,5 mm, pores de 8 µm). Les membranes de polycarbonate ont été préalablement tapissées de 50 µg de Matrigel (Sigma Aldrich) extrait de tumeurs d'Engelbreth-Holm-Swarm de Souris et riche en protéines de la matrice extracellulaire. Le Matrigel a été dilué à la concentration de 1 mg/mL dans une solution de DMEM en présence ou en absence de 3-MA ou de wortmannine. Cinquante µL de cette solution ont été déposés sur chaque membrane, puis la polymérisation du gel a été obtenue par incubation des inserts à 37°C pendant 7h. Les cellules ont étéensemencées dans le compartiment supérieur à raison de 10^5 cellules par insert dans 250 µl de milieu sans SVF. Cinq cent µL de milieu complet ont ensuite été ajoutés dans le compartiment inférieur. Après 24h d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, les cellules ont été fixées à l'éthanol 100% pendant 5 min. Les cellules de la face supérieure, qui n'ont pas traversé la membrane, ont été éliminées par grattage à l'aide d'un bâtonnet ouaté. Les cellules restant sur la face inférieure des membranes ont été colorés par addition de 1 mL d'une solution de crystal violet 0,5% (p/v)/éthanol 2% (v/v) durant 10 min. L'excès de colorant a été éliminé par trois lavages de la membrane à l'eau distillée. Les cellules ont ensuite été comptées en utilisant un microscope inversé dans 5 champs par membrane, à un grossissement X400. Les cellules comptées correspondent aux cellules qui ont traversé la couche de Matrigel puis la membrane poreuse de la chambre de Boyden ; elles sont donc le reflet des capacités d'invasion des cellules tumorales au travers d'une matrice extracellulaire ou d'une membrane basale, ici reproduite par le Matrigel.

4. Test de migration cellulaire

4.1. Test de migration cellulaire en chambre de Boyden

L'étude de la migration cellulaire a été réalisée dans des chambres de Boyden (SPL Life Sciences, diamètre de 6,5 mm, pores de 8 μm). Les cellules ont étéensemencées dans le compartiment supérieur à raison de 10^5 cellules par insert dans 250 μL de milieu sans SVF. Dans le compartiment inférieur, 500 μL de milieu complet ont été ajoutés. Après 24h d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO_2 , les cellules ont été fixées à l'éthanol 100% pendant 5 min. Les cellules de la face supérieure, qui n'ont pas traversé la membrane, ont été éliminées par grattage à l'aide d'un bâtonnet ouaté. Les cellules restant sur la face inférieure des membranes ont été colorées par addition de 1 mL d'une solution de crystal violet 0,5% (p/v)/éthanol 2% (v/v) durant 10 min. L'excès de colorant a été éliminé par trois lavages de la membrane à l'eau distillée. Les cellules ont ensuite été comptées en utilisant un microscope inversé dans 5 champs par membrane, à un grossissement X400. Les cellules comptées correspondent aux cellules qui ont traversé la membrane poreuse de la chambre de Boyden ; elles sont donc le reflet des capacités de migration des cellules tumorales.

4.2. Test de migration cellulaire en blessure cicatrisation

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de 5×10^5 cellules par puit. Une fois les cellules confluentes, deux blessures ont été créées dans chaque puit à l'aide d'une pointe de pipette. Le milieu a ensuite été éliminé et les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X afin d'éliminer les cellules détachées. La fermeture de la blessure a été contrôlée à T_0 , T_{24h} et T_{48h} . L'aire de la blessure a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. La migration des cellules a été exprimée en pourcentage de fermeture de la blessure : % de fermeture = $[(A_{t_0h} - A_{t_{\Delta h}})/A_{t_0h}] \times 100\%$. A_{t_0h} est l'aire mesurée immédiatement après la blessure et $A_{t_{\Delta h}}$ est l'aire mesurée 24 ou 48 h après la blessure.

5. Test d'adhérence cellulaire

Les cellules ont étéensemencées en plaques 24 puits à raison de 4×10^5 cellules par puit dans du milieu sans SVF. Après 1 h et 3 h d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO_2 , les cellules ont été décollées par ajout de trypsine puis comptées en cellule de Malassez. Les

résultats ont été exprimés sous forme de ratio entre les cellules adhérentes et le nombre total de cellules ensemencées.

6. Zymographie

La zymographie permet la révélation des métalloprotéases comme MMP-2 et MMP-9. Un gel de polyacrylamide à 10 % (p/v) contenant 0,1 % (p/v) de gélatine a été préparé. Les surnageants de culture ont été repris dans du tampon SB5X sans β -mercaptoéthanol dans un volume de 30 μ l. La migration des échantillons a été faite dans les mêmes conditions qu'une électrophorèse SDS-PAGE. Après migration des échantillons, l'excès de SDS a été éliminé du gel par 2 lavages de 30 min dans un bain d'eau distillée contenant 2,5 % (p/v) de Triton X-100, permettant ainsi la renaturation des protéines. Le gel a été ensuite incubé pendant 24 h à 37°C dans un tampon d'activation contenant 1 M Tris-HCl pH 8, 1M CaCl₂, 0,5 M ZnSO₄ et 2,5 M NaCl. Les MMPs sont calcium-dépendantes d'où l'addition de CaCl₂ dans le tampon d'activation. Le lendemain, le gel a été coloré à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie G-250 (bleu de Coomassie G-250 0,1 % p/v, 10 % v/v acide acétique, 40 % v/v méthanol) pendant 1 h puis décoloré à l'aide d'une solution 10 % v/v d'acide acétique et 30 % v/v de méthanol, le gel a été étudié à l'aide du système d'analyse d'image Chemidoc couplé au logiciel Image Lab (BioRad).

V. XENOGRÉFFES

Les xénogreffes ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr Christophe Borg « Interactions Hôte-Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génique » (UMR1098) à Besançon avec l'aide technique du Dr. Jean-René Pallandre.

1. Xénogreffe des lignées MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1 et shQSOX1-2

Les cellules MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1 et shQSOX1-2 ont été précédemment injectées en sous-cutané au niveau du flanc droit dans des souris CIEA NOG. Lorsque la tumeur présentait une nécrose ou une longueur supérieure à 1 cm, les souris ont été sacrifiées. Après résection des tumeurs, celles-ci ont été fixées dans une solution de PFA 4% puis conservées en tampon sucrose 10%. Les tumeurs ont ensuite été incluses en milieu d'enrobage Tissue-Tek

(Microm, F/62550-1) découpées au cryostat (Microm microtek, HM560), placées sur lame et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation en immunofluorescence.

2. Xénogreffe des lignées MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 et GL1 G116A c2

Une semaine avant l'injection et pendant toute la durée de l'expérience, 1 µg/ml d'estrogènes (E₂) a été ajouté à l'eau des souris. Pour chaque lignée cellulaire, 1,5 x 10⁶ cellules ont ensuite été injectées en sous-cutané au niveau du flanc droit des souris RAGg/c. Après que les xénogreffes aient été palpables, des mesures ont été réalisées tous les 4-5 jours. Les volumes des tumeurs ont été estimés en utilisant la formule suivante : $V = a \times b^2$, où **a** est la longueur et **b** la largeur de la tumeur. Lorsque la tumeur présentait une nécrose ou une longueur supérieure à 1 cm, les souris ont été sacrifiées. Après résection des tumeurs, celles-ci ont été fixées dans une solution de formol pendant une nuit à 4°C puis conservé dans une solution de sucrose 10% avant d'être photographiées. Les tumeurs ont ensuite été incluses en milieu d'enrobage Tissue-Tek découpées au cryostat, placées sur lame et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation en immunofluorescence.

3. Immunofluorescence sur coupe de tumeurs

Les lames ont été incubées dans un tampon citrate de sodium (10 mM citrate de sodium, pH 6) à 95°C pendant 40 min. Les lames ont ensuite été incubées une nuit avec l'anticorps primaire et 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-Triton X100 1%. Après chaque incubation, les lames ont été rincées 3 fois dans du PBS-Triton X100 1%. Les lames ont été montées dans un milieu PBS-glycerol puis observées au microscope confocal

RESULTATS

I. ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE QSOX1 DANS L'AUTOPHAGIE DES CELLULES DE CANCER DU SEIN

1. QSOX1 (Quiescine sulfhydryl oxydase 1) : Gène et protéine

Au cours de ma thèse, j'ai pu étudier la protéine QSOX1 (ou QSCN6 : Quiescin 6) impliquée dans les stress oxydants, les stress du RE et dans le cancer, des mécanismes étroitement liés à l'autophagie, suggérant un rôle de QSOX1 dans ce processus. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à cette protéine qui sera décrite dans la suite de ce manuscrit.

Le gène *QSOX1* a été identifié au sein de notre laboratoire comme étant régulé négativement par les estrogènes dans un modèle de cellules épithéliales glandulaires d'endomètre de Cobaye (Pellerin *et al.*, 1993). Le gène *QSOX1* humain (ou *HQSOX1*) est localisé sur le chromosome 1 au locus 1q24 et est organisé en 12 exons et 11 introns (Heckler *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 1996) (**Figure 16**). Chez l'homme, il existe deux transcrits majoritaires, *QSOX1-S* (Short) et *QSOX1-L* (Large) aussi appelés *QSOX1A* et *QSOX1B* d'environ 2,5 kb et 3,2 kb (Coppock *et al.*, 1993; Musard *et al.*, 2001; Radom *et al.*, 2006). Il a été mis en évidence que ces transcrits sont obtenus par épissage alternatif au niveau de l'exon 12 chez l'homme mais également chez le rat (Radom *et al.*, 2006; Thorpe *et al.*, 2002) (**Figure 16**). Ces 2 transcrits permettent de coder 2 protéines de 604 acides aminés (66 kDa) et 747 acides aminés (82 kDa) nommées respectivement QSOX1-S et QSOX1-L.

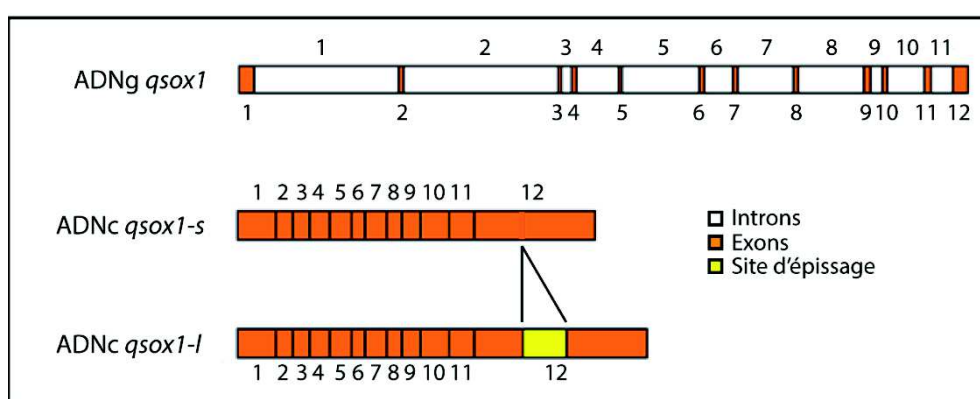


Figure 16 : Schéma représentant le gène *QSOX1* humain et ses deux transcrits *QSOX1-S* et *QSOX1-L*. Le gène *QSOX1* humain possède 12 exons et 11 introns. L'épissage alternatif au niveau de l'exon 12 permet l'obtention de deux transcrits majoritaires appelés *QSOX1-S* et *QSOX1-L*. D'après (Thorpe *et al.*, 2002).

L'expression tissulaire des messagers *QSOX1* semble être ubiquitaire mais à des taux variables. En effet, les transcrits *QSOX1-S* et *QSOX1-L* sont exprimés dans de nombreux

organes tels que le cœur, le foie, le pancréas, le colon, les ovaires, l'intestin grêle et les testicules par exemple (Coppock *et al.*, 2000; Musard *et al.*, 2001). Néanmoins, le pharynx et la glande parathyroïdienne ne semblent pas exprimer les transcrits *QSOX1* (Kodali & Thorpe, 2010). Comme les messagers, la protéine QSOX1 est exprimée dans de nombreux tissus et en particulier dans les tissus à vocation de sécrétion tels que les îlots de Langerhans, l'intestin grêle, le tissu placentaire, l'épithélium pulmonaire, les cellules plasmiques, les glandes sébacées, les follicules des cheveux et les cellules épithéliales de l'épiderme (Hashimoto *et al.*, 2000; Thorpe & Coppock, 2007; Thorpe *et al.*, 2002).

La protéine QSOX1 possède une séquence signal d'adressage au RE, à l'appareil de Golgi et aux vésicules de sécrétion mais ne possède pas de séquence de rétention à ces compartiments (séquence KDEL), suggérant ainsi une localisation extracellulaire de cette protéine (Chakravarthi *et al.*, 2007; Mairet-Coello *et al.*, 2004; Thorpe *et al.*, 2002; Tury *et al.*, 2004). En effet, des études ont mis en évidence la présence des protéines QSOX1 au niveau de la membrane de différents compartiments (RE, appareil de Golgi et vésicules de sécrétion) ainsi que dans les surnageants de culture et dans les espaces extracellulaires (Benayoun *et al.*, 2001; Musard *et al.*, 2001; Tury *et al.*, 2004). QSOX1 a également été mise en évidence dans le cytoplasme et au niveau périnucléaire (Matsuba *et al.*, 2002; Thorpe *et al.*, 2002).

2. Fonctions de QSOX1

2.1. Fonction enzymatique

Les protéines QSOX1 appartiennent à la famille des sulfhydryls oxydases dépendantes du FAD (flavine adénine dinucléotide) et oxydent des groupements sulfhydryls en ponts disulfures dans des peptides ou des protéines avec une réduction de l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène (Hooper *et al.*, 1996) (**Figure 17**).

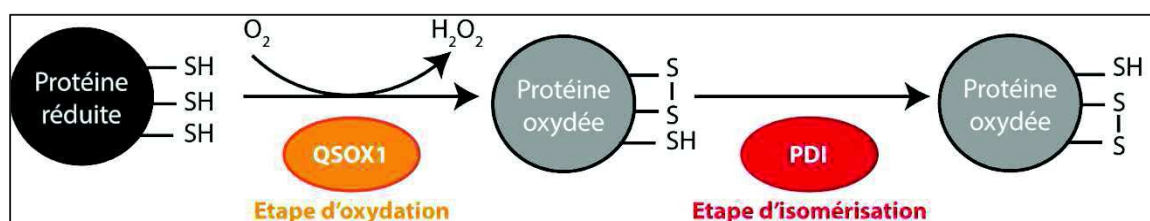


Figure 17 : Schéma de la réaction catalysée par les sulfhydryls oxydases. QSOX1 est une sulfhydryl oxydase, capable d'oxyder les groupements thiols en réduisant l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène. QSOX1 permet ainsi d'oxyder les protéines avant que celles-ci soient isomérisées par la PDI

QSOX1 pourrait introduire des ponts disulfures rapidement dans les protéines réduites avant que celles-ci ne soient prises en charge par la PDI (proteïn disulfide isomerase), une

protéine responsable de l'isomérisation des ponts disulfures et du repliement correct des protéines favorisant ainsi leur stabilité (Hooper *et al.*, 1999). Cette activité joue un rôle par exemple dans la synthèse de la matrice extracellulaire par les fibroblastes et dans l'adhésion des cellules cancéreuses à cette matrice. En effet, QSOX1 permet l'incorporation de laminine à la matrice extracellulaire (Ilani *et al.*, 2013). Par cette fonction, QSOX1 serait également impliquée dans les mécanismes mis en jeu lors des stress cellulaires.

2.2. Rôle de QSOX1 dans les stress

Des travaux de notre équipe ont montré que les stress oxydants induisent tardivement une augmentation des messagers et de la protéine QSOX1 dans des cellules PC12 (cellule de phéochromocytome de la médullosurrénale de rat). En effet, l'induction d'un stress oxydant par H₂O₂ conduit à l'augmentation du taux de messagers *QSOX1* dès 24h et atteint un pic d'expression à 72h. De plus, les cellules surexprimant QSOX1-S sont protégées contre l'apoptose induite par ce stress oxydant (Morel *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il a été montré qu'une induction de la réponse UPR par un traitement à la tunicamycine, à la thapsigargine ou au DTT induit une augmentation de l'expression du messager *QSOX1* et de la protéine QSOX1-S. De plus, la surexpression de QSOX1 rend les cellules de cancer du sein MCF-7 moins sensibles à la réponse UPR induite par la thapsigargine tandis que l'extinction de cette protéine dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 rend ces cellules plus sensibles aux traitements (données non publiées). L'ensemble de ces résultats suggère que QSOX1 peut protéger les cellules contre la mort induite par l'UPR.

2.3. Rôle de QSOX1 dans le cancer

Plusieurs études ont suggéré que QSOX1 pourrait être associée aux processus tumoraux. Ainsi, QSOX1 est surexprimée au cours des étapes précoces de la progression tumorale des cancers de la prostate et dans les adénocarcinomes pancréatiques (Antwi *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). Il a également été mis en évidence que QSOX1 favorise l'invasion et la prolifération des cellules tumorales par l'activation des métalloprotéases et que l'ARNm de *QSOX1* est associé à un marqueur de mauvais pronostic dans les tumeurs lumineales B (Katchman *et al.*, 2011; Katchman *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été montré qu'un nouveau transcrit de *qsox1* est surexprimé dans le cancer du sein ductal et que cette augmentation est associée au grade de la tumeur (Soloviev *et al.*, 2013). De plus, il a été mis en évidence que

l'hypoxie induit l'expression du messenger et de la protéine QSOX1 *via* HIF-1 α dans les cellules de cancer du pancréas et que l'extinction de QSOX1 conduit à l'inhibition de l'invasion induite par l'hypoxie dans ces cellules (Shi *et al.*, 2013). Une forte expression de QSOX1 a également été associée à un facteur de mauvais pronostic et à une faible survie des patients atteints de neuroblastomes (Araujo *et al.*, 2014).

Par contre, dans d'autres types de cancer, il a été montré une diminution de l'expression de QSOX1. Ainsi, l'expression du gène *QSOX1* est réprimée par désacétylation des histones dans un modèle cellulaire de tumeurs endothéliales où cette protéine inhibe la prolifération cellulaire (Hellebrekers *et al.*, 2007). Des résultats de notre laboratoire en collaboration avec l'équipe du Dr F. Descotes (CHU de Lyon Sud) ont mis en évidence qu'une forte expression de *QSOX1* est associée à un facteur de bon pronostic dans les cancers du sein. De plus, notre équipe, en utilisant des modèles cellulaires de surexpression (MCF-7) et d'extinction (MDA-MB-231) de QSOX1-S, a montré que cette protéine réduirait la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire *in vitro* en régulant négativement l'activité de la métalloprotéase MMP-2 et réduirait le développement tumoral *in vivo* (Pernodet *et al.*, 2012). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment *in vitro* sur le rôle de QSOX1 dans la prolifération et l'adhérence cellulaire (Coppock *et al.*, 2000; Coppock *et al.*, 1993; Hellebrekers *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2007; Musard *et al.*, 2001). Plus récemment, il a également été mis en évidence que l'expression du messenger et de la protéine QSOX1 est réprimée dans les cellules souches mésenchymateuses dérivées de cancer du poumon qui présentent une prolifération plus importante que les cellules saines (Gottschling *et al.*, 2013). Le rôle de QSOX1 dans le cancer est donc complexe principalement à cause de l'existence de ces différents transcrits. Sa fonction dans le cancer semble également dépendre du type et du stade de la tumeur. Par exemple, l'expression de QSOX1 dans les médulloblastomes ne semble pas avoir de valeur pronostique mais cette protéine semble impliquée dans le développement de la maladie (Sobral *et al.*, 2015).

Comme nous l'avons décrit précédemment, les stress oxydants et du RE sont des inducteurs de l'autophagie et il existe un lien étroit entre autophagie et cancer. De plus, une recherche systématique des acteurs impliqués dans la régulation de l'autophagie, réalisée sur plus de 20000 gènes, a suggéré que QSOX1 pourrait inhiber l'autophagie dans des cellules de neuroblastomes H4 (Lipinski *et al.*, 2010a). En effet, dans ces cellules, l'extinction de plusieurs gènes dont *qsox1* par la technique d'interférence ARN conduit à une augmentation de la formation des autophagosomes. L'objectif initial de ma première année de thèse a donc été de déterminer si l'expression de QSOX1-S était régulée suite à l'induction de l'autophagie et si QSOX1-S avait un rôle dans ce processus qui pourrait expliquer ses fonctions dans les cellules cancéreuses. L'ensemble de cette étude a été réalisée à partir deux modèles cellulaires de cancer du sein : un

modèle de surexpression de QSOX1-S dans les cellules MCF-7 et un modèle d'extinction de QSOX1 dans les cellules MDA-MB-231. Les résultats de notre étude ont permis de montrer que :

- **L'induction de l'autophagie suite à une carence en acides aminés conduit à une augmentation de l'expression de QSOX1 aux niveaux messagers et protéines.**
- **L'expression de la protéine QSOX1 conduit à une inhibition de la mort cellulaire lors de l'induction de l'autophagie par une carence en acides aminés.**
- **La protéine QSOX1 inhibe le flux autophagique des cellules de cancer du sein en inhibant la fusion autophagosome/lysosome.**
- **La protéine QSOX1 pourrait inhiber l'invasion des cellules de cancer du sein par sa fonction inhibitrice sur l'autophagie.**

L'ensemble de ces résultats est présenté dans la **Publication I**.

Publication I:
QSOX1 Inhibits Autophagic Flux in Breast Cancer Cells

Laura Poillet, Nicolas Pernodet, Michaël Boyer-Guittaut, Pascale Adami,
Christophe Borg, Michèle Jouvenot, Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy

PLOS ONE (2014)

QSOX1 Inhibits Autophagic Flux in Breast Cancer Cells

Laura Poillet¹, Nicolas Pernodet¹, Michaël Boyer-Guittaut¹, Pascale Adami¹, Christophe Borg², Michèle Jouvenot¹, Régis Delage-Mourroux¹, Gilles Despouy^{1*}

¹ Université de Franche-Comté, Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, U.F.R. Sciences et Techniques, Besançon, Doubs, France,

² Université de Franche-Comté, Inserm UMR 1098, Relation Hôte Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génique, Besançon, Doubs, France

Abstract

The QSOX1 protein (Quiescin Sulfhydryl oxidase 1) catalyzes the formation of disulfide bonds and is involved in the folding and stability of proteins. More recently, QSOX1 has been associated with tumorigenesis and protection against cellular stress. It has been demonstrated in our laboratory that QSOX1 reduces proliferation, migration and invasion of breast cancer cells *in vitro* and reduces tumor growth *in vivo*. In addition, QSOX1 expression has been shown to be induced by oxidative or ER stress and to prevent cell death linked to these stressors. Given the function of QSOX1 in these two processes, which have been previously linked to autophagy, we wondered whether QSOX1 might be regulated by autophagy inducers and play a role in this catabolic process. To answer this question, we used *in vitro* models of breast cancer cells in which QSOX1 was overexpressed (MCF-7) or extinguished (MDA-MB-231). We first showed that QSOX1 expression is induced following amino acid starvation and maintains cellular homeostasis. Our results also indicated that QSOX1 inhibits autophagy through the inhibition of autophagosome/lysosome fusion. Moreover, we demonstrated that inhibitors of autophagy mimic the effect of QSOX1 on cell invasion, suggesting that its role in this process is linked to the autophagy pathway. Previously published data demonstrated that extinction of QSOX1 promotes tumor growth in NOG mice. In this study, we further demonstrated that QSOX1 null tumors present lower levels of the p62 protein. Altogether, our results demonstrate for the first time a role of QSOX1 in autophagy in breast cancer cells and tumors.

Citation: Poillet L, Pernodet N, Boyer-Guittaut M, Adami P, Borg C, et al. (2014) QSOX1 Inhibits Autophagic Flux in Breast Cancer Cells. PLoS ONE 9(1): e86641. doi:10.1371/journal.pone.0086641

Editor: Jun Li, Sun Yat-sen University Medical School, China

Received: September 17, 2013; **Accepted:** December 13, 2013; **Published:** January 24, 2014

Copyright: © 2014 Poillet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Laura Poillet is supported by a fellowship from the Région de Franche-Comté. This work was supported by grant from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gilles.despouy@univ-fcomte.fr

Introduction

Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 (QSOX1) was described in our laboratory as an estrogen-regulated gene in guinea-pig endometrial glandular epithelial cells [1]. The human QSOX1 gene, localized on chromosome 1 (1q24), encodes two major protein isoforms, QSOX1-S (66 kDa) and QSOX1-L (82 kDa), resulting from an alternative mRNA splicing process (QSOX1-S: NM_001004128; QSOX1-L: NM_002826) [2,3]. Immunoelectron microscopy experiments have shown that the QSOX1 protein is linked to the endoplasmic reticulum (ER) membrane, the Golgi apparatus and to secretory granules [4] and has also been detected in culture supernatants and extracellular spaces [1,5], suggesting its extracellular secretion. QSOX1 proteins belong to the flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent sulfhydryl oxidase family and catalyze the formation of disulfide bonds in unfolded proteins [6]. This activity has been proposed to play an important role for incorporation of laminin in extracellular matrix (ECM) synthesized by fibroblasts and the adhesion of cancer cells to the ECM [7].

More recently, QSOX1 has been associated to cancer and protection against cellular stress. In fact, several studies have shown a deregulation of QSOX1 expression in cancer cells [8,9,10] and its involvement in tumorigenesis. Indeed, in our laboratory, we have demonstrated that QSOX1 reduces proliferation, migration, invasion *in vitro* and tumorigenesis *in vivo* which is in agreement with our findings, indicating that a high QSOX1

expression is associated with a better survival for breast invasive ductal carcinomas patients [11]. These results are in agreement with those previously obtained *in vitro* regarding the role of QSOX1 in proliferation and cell adhesion [1,12,13,14,15]. On the contrary, it has been demonstrated that QSOX1 promotes invasion and proliferation of pancreatic and breast tumor cells *in vitro* and that QSOX1 mRNA is a predictive marker of poor survival in luminal B tumor [16,17]. Recently, Soloviev and colleagues have demonstrated that QSOX1 mRNA is overexpressed in breast ductal carcinoma and that this increase is correlated to the tumor grade [18]. Therefore, it is now clear that the role of QSOX1 in cancer is complex mainly because of the existence of its different transcripts and that its function seems to depend on the stage and type of tumor.

Furthermore, we have shown that QSOX1 protects cells against cellular stressors. Indeed, QSOX1 mRNA and protein levels are increased following an oxidative or an ER stress and QSOX1 protects against stress-induced-cell death [15] (unpublished data).

Cancer and protection against cellular stressors are two processes that have previously been linked to autophagy. Autophagy, a cellular degradation process involved in the degradation and recycling of damaged proteins, organelles and other cytoplasmic constituents, occurs at low basal levels in almost every cell type to maintain cellular homeostasis. Following a metabolic stress, such as nutrient starvation, oxidative stress or ER stress, autophagy is induced to provide nutrients and energy

allowing cell survival [19]. Three types of autophagy have been described: macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy [20]. Macroautophagy (hereafter called autophagy) is a multi-step process involving initiation, elongation, maturation and degradation steps. The initiation step is characterized by the induction of a unique double membrane structure called the phagophore that sequesters part of the cytoplasm, soluble proteins and/or organelles. The elongation and closure of this phagophore results in the formation of a double-membrane organelle called the autophagosome which ultimately fuses with the lysosome to form the autophagolysosome, leading to the degradation of its contents [21].

Besides its role in cellular homeostasis, autophagy has been described to be involved in various cancers such as breast cancer [22,23,24]. However, the role of autophagy in cancer formation and growth is complex and context-dependent. During the early stages of tumorigenesis, autophagy acts as a tumor suppressor mechanism by preventing cytoplasmic damage, genomic instability and inflammation which usually lead to cancer initiation and development [25,26]. Moreover, expression levels of proteins involved in autophagy are reduced or lost in several types of cancers [27,28,29]. For example, *Beclin1* gene is deleted in 50% of breast cancer [27,30]. On the contrary, during the later stages of cancer growth, autophagy promotes survival of cancer cells under conditions of metabolic stress. Indeed, the microenvironment of cancer cells presents reduced levels of nutrients, oxygen and growth factors leading to decreased oxidative phosphorylation, decreased ATP production and limited cancer cell proliferation [31,32]. For example, it has been shown that the inhibition of autophagy by a *fip200* (FAK family-interacting protein of 200 kDa) gene deletion in a mouse model of human breast cancer leads to reduced tumor initiation and progression by both the impairment of tumor cell proliferation and the induction of immune surveillance [33].

Given the function of QSOX1 in cancer and protection against cellular stressors, two processes linked to autophagy, the purpose of our study was to determine whether QSOX1 could be regulated by autophagy inducers and might play a role in this catabolic process that could explain its function during breast tumor development. We showed in this study, that QSOX1 expression is increased following nutrient stress-induced autophagy and maintains cellular homeostasis. Our results also indicated that QSOX1 inhibits autophagy through the inhibition of autophagosome/lysosome fusion in breast cancer cell line. Therefore, we propose that its inhibitory effect on autophagy might explain its function in cancer cell invasion and tumor growth.

Materials and Methods

Reagents and Antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen. Earle's balanced salt solution (EBSS, E3024), bafilomycin A1 (B1793), 3-methyladenine (3-MA) (M9281) and wortmannin (W1628) were purchased from Sigma Aldrich. For the western blotting experiments, the following antibodies were used: polyclonal anti-rat QSOX1 [5] diluted at 1:7500, polyclonal anti-LC3 (Sigma, L8918) diluted at 1:3000, monoclonal anti-p62 (Santa Cruz, sc-28359) diluted at 1:1500, polyclonal anti-actin (Sigma, A5060) diluted at 1:15000, polyclonal anti-rabbit (P.A.R.I.S, BI2407) diluted at 1:10000 and polyclonal anti-mouse (P.A.R.I.S, BI24130) diluted at 1:10000. For the immunofluorescence experiments, the following antibodies were used: monoclonal anti-p62 antibody (Santa Cruz, sc-28359) diluted at 1:250, monoclonal anti-mouse lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) (Abcam,

Ab25630) diluted at 1:100, Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Life technologies, A-21422) diluted at 1:800.

Cell Culture and Treatment

Two breast cancer cell lines were used: MCF-7 in which QSOX1-S is overexpressed (MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2) and MDA-MB-231 in which QSOX1 is extinguished (MDA-MB-231 shQSOX1-1 and shQSOX1-2). In every experience, we compared these stable cell lines to the control ones (MCF-7 C transfected with an empty control vector and MDA-MB-231 shC expressing a control shRNA). These cellular models have previously been described [11]. MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells show similar overexpression of QSOX1 whereas MDA-MB-231 shQSOX1-1 and shQSOX1-2 cells show 55% and 92% of QSOX1 extinction, respectively [11]. MCF-7 cells were chosen to overexpress QSOX1 since this protein is weakly expressed in these cells. On the contrary, MDA-MB-231 cells were selected because they present a high expression of endogenous QSOX1 [11,14].

Cells were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (PAA, E15-891) supplemented with 100 µg/ml penicillin/streptomycin (PAA, P11-010) and 5% fetal bovine serum (FBS) (PAA, A15-101) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. To inhibit autophagosome/lysosome fusion, cells were incubated for 8 h in complete medium supplemented with 100 nM bafilomycin A1. To induce autophagy, cells were incubated in EBSS for 2 to 8 h at 37°C. To inhibit autophagy, cells were incubated in complete medium supplemented with 10 mM 3-MA or with 100 nM wortmannin for 24 h.

Western Blotting

Cells were scraped, harvested and lysed in a RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0.5% DOCA, 0.1% SDS) supplemented with 0.1% protease inhibitors (104 mM AEBSF, 1.5 mM pepstatin A, 1.4 mM E-64, 4 mM bestatin, 2 mM leupeptin, 80 µM aprotinin). Protein lysates were sonicated for 5 s before loading (Sonic and Materials), separated on a 10–12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before being transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, 162–0177). The membrane was blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with primary antibodies at the previously indicated dilutions. Immunoreactive bands were detected using goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies and the *p*-coumaric acid-enhanced chemiluminescent (PCA-ECL) solution [34].

Cell Viability

For the MTT assay, cells (1.3×10^4 cells/well) were cultured in a 96-well plate and incubated with EBSS for 4 and 8 h. After the removal of the supernatant, 100 µl of 100 mM MTT solution (Sigma, M2128) in Hank's were added to the cells. After a 2 h incubation, the formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (50 µl) and the absorbance was quantified at 549 nm using a microplate reader (Multiskan FC, ThermoScientific). All experiments were performed in 8 replicates, and the relative cell viability (%) was normalized to the untreated control cell.

For the trypan blue exclusion assay, cells (7.6×10^4 cells/well) were seeded in a 24-well plate in duplicate and incubated with EBSS for 4 and 8 h. Cells were then collected by trypsinization, stained with trypan blue (0.04%) (Sigma, T8154) and cells were

counted in triplicate. Data were obtained from two independent experiments.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

The green fluorescent protein-microtubule-associated protein light chain 3 (GFP-LC3) plasmid was kindly provided by Dr. Elazar (Weizmann Institute, Israël). For transient GFP-LC3 transfection, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated on coverslips in 6-well plates on coverslips at a density of 4.5×10^5 and 3×10^5 cells/well, respectively. Plasmids were transfected using the Jetprime reagent (Polyplus transfection, 114-07) according to the manufacturer's protocol. After the designated treatments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma, P6148) in PBS for 15 min at room temperature. The cells were then examined and photographed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000).

For Lysotracker staining, cells were incubated for 1 h in complete medium supplemented with 500 nM Lysotracker red DND-99 (Invitrogen, L75-28). Cells were then washed with PBS and fixed with 4% PFA in PBS for 15 min at room temperature. Cells were then analyzed by confocal microscopy.

For LAMP1 immunofluorescence, cells were washed with PBS and fixed with 4% PFA in PBS for 15 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.2% Triton-X100 in PBS for 5 min, washed with PBS, blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, A6793) in PBS for 30 min, incubated with an anti-mouse LAMP1 primary antibody overnight at 4°C and finally with an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse for 1 h at the previously indicated dilutions. The cells were analyzed using a confocal microscope. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random.

GFP-LC3 and Lysotracker red or LAMP1 colocalization was analyzed using the ImageJ software and the Pearson's coefficient. For each cell line, 35 cells were randomly selected.

For immunofluorescence staining of tumor tissue sections, the slides were incubated at 95°C for 40 min in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, pH 6). The tissue sections were then incubated overnight with the previously described p62 antibody and incubated for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse secondary antibody at previously indicated dilutions and with DAPI (1:333) (AAT bioquest, 17510) in PBS for 10 min. After each incubation, the slides were rinsed thrice in 1% PBS-Triton X-100. After being mounted in PBS-glycerol mounting medium, the slides were observed and analyzed using confocal microscopy.

Real-time PCR

Total RNAs were extracted as previously described [15]. For real time RT-PCR analysis, 2 µg of total RNAs were reverse transcribed using the RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, EP0441) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative PCR was performed using the Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) and the SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4309155). The primers used for QSOX1 (Targeting endogenous QSOX1-S and QSOX1-L mRNA) were p85r: 5'-AATCAAGCATGTGTAAGGCAC-3' and p85s: 5'-GACCTGACGAGTTGGT-3' and the ones used for p62 were p62_F_Hs: 5'-ATCGGAGGATCCGAGTGT-3' and p62_R_Hs: 5'-TGGCTGTGAGCTGCTCTT-3'. The PCR signals were normalized with the endogenous control (H3.3 like histone H3B-2) amplified with the primers His-I: 5'-GCTAGCTGGATGTCTTTTGG-3' and His-N: 5'-GTGGTAAAGCACCCAGGAA-3'.

Cell Invasion Assay

50 µl of extra cellular matrix (ECM) gel (1 mg/ml) (Sigma, E6909) were added to the upper chamber and incubated for 5 h at 37°C. 10^5 cells were subsequently diluted in 250 µl serum-free medium, added to the upper chamber and incubated for 24 h at 37°C in the presence or absence of an autophagy inhibitor (3-MA or wortmannin). The cells on the upper surface were removed using a cotton bud while the remaining invasive cells were fixed with 100% ethanol, stained with 2% crystal violet and images from each membrane were taken. Finally, the invasive cells located in the lower chamber were counted manually in 10 fields of view (FOV).

Xenograft Experiments

CIEA NOG mice were obtained from Taconic (Germantown, NY, USA) and maintained in the UMR1098 animal facility (agreement number #C25-056-7). Approval for animal experimentation and care was received from the Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale delivered by the Ministère de l'Agriculture, Paris, France and experimental procedures were approved by a local ethic committee (Comité d'Ethique Bisontin d'Expérimentation Animale [CEBEA]).

As previously described [11], MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1 and shQSOX1-2 cells were subcutaneously inoculated in NOG mice and tumor growth was monitored twice a week. When tumors reached a diameter of 1 cm, mice were sacrificed and each tumor was fixed in formol and photographed.

Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using a Student's t test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

QSOX1 is Induced Following Nutrient Stress and Protects against Cell Death

Our laboratory has previously described that oxidative [15] or ER stress (unpublished data) induces QSOX1 expression and that this protein protects cells against these cellular stresses. Since these stressors can also induce autophagy, we investigated whether amino acid starvation could induce QSOX1 mRNA and protein expression. To do so, starvation was induced in MDA-MB-231 shC cells by an EBSS treatment of 2, 4, 6 or 8 h. An increase in QSOX1 expression was detected from 2 h of EBSS treatment. The highest fold increase was observed after 8 h of EBSS treatment for QSOX1 mRNA expression (2.5) (**Figure 1A**) and after 6 h of EBSS treatment for QSOX1 protein expression (2.2) (**Figure 1B**). These results demonstrate that nutrient stress can induce QSOX1 mRNA and protein.

Since amino acid starvation can regulate cell viability, we then examined whether QSOX1 could protect the cells against such stress. To do so, we used two breast cancer cell lines: MCF-7 in which QSOX1-S is overexpressed (MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2) and MDA-MB-231 in which QSOX1 is extinguished (MDA-MB-231 shQSOX1-1 and shQSOX1-2) [11]. Overexpression was induced in MCF-7 because of their initial low expression of QSOX1 whereas extinction was performed in MDA-MB-231 cells because of their endogenous high expression of QSOX1. The viability of these cellular models was assessed using a MTT assay following an 8 h treatment with EBSS. MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells (65% and 76%, respectively) presented a higher viability than MCF-7 C cells (52%). On the other hand, MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells (62% and 63%,

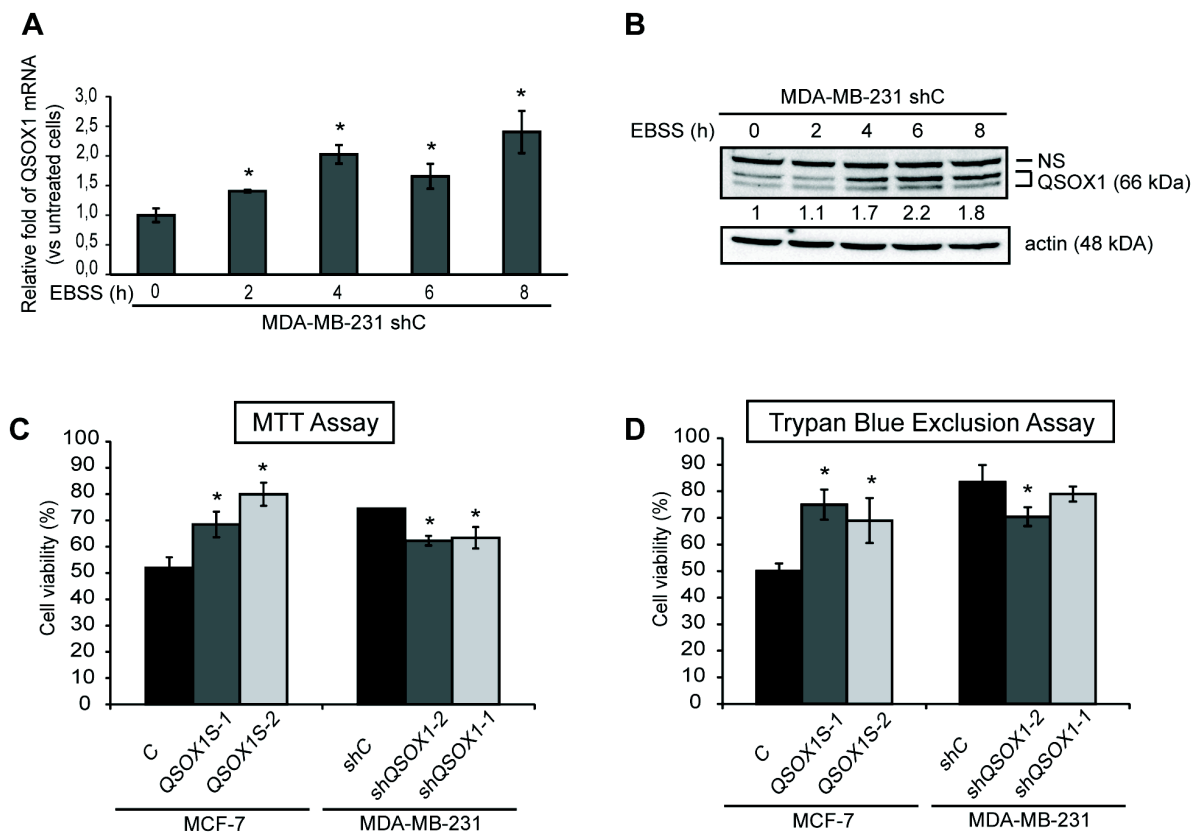


Figure 1. QSOX1 is induced following a nutrient stress and protects against cell death. (A, B) MDA-MB-231 shC cells were cultured in the presence or absence of EBSS for 2, 4, 6 and 8 h. (A) After a reverse transcription step, relative QSOX1 mRNA expression was determined by qPCR. H3B-2 mRNA was used for normalization. Data are means \pm S.D. of two independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, compared to the control. (B) Cells were lysed and total proteins (50 μ g) were separated on a 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-QSOX1 and anti-actin antibodies. QSOX1 levels were quantified using the Image Lab software. NS: Non specific signal. (C, D) MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 and MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 cells were cultured in the presence or absence of EBSS for 8 h. Cell viability was estimated using a MTT assay (C) or a trypan blue exclusion assay (D). Results were expressed as a ratio between treated and untreated cells. Data are means \pm S.D. of two independent experiments performed in 8 replicates for the MTT assay and in duplicate for the trypan blue exclusion assay). * $P < 0.05$ compared to the control.

doi:10.1371/journal.pone.0086641.g001

respectively) showed a lower viability compared to MDA-MB-231 shC cells (74%) (Figure 1C).

The percentage of living cells was also determined using a trypan blue exclusion test. The results were similar to those obtained with the MTT assay. MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells (75% and 69%, respectively) showed a higher viability than MCF-7 C cells (50%), while MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells (73% and 81%, respectively) presented a lower viability compared to MDA-MB-231 shC cells (88%) (Figure 1D). Similar results were also obtained after a 4 h treatment with EBSS (Data not shown). Altogether, our data demonstrate that QSOX1 is induced following amino acid starvation and protects against a nutrient stress-induced cell death.

QSOX1 Inhibits Autophagic Flux

During autophagy, the microtubule-associated-protein light chain 3 (LC3) is cleaved to give the cytoplasmic mature form (LC3-I). During autophagosome elongation, LC3-I is conjugated to phospholipids to give the membrane-associated form (LC3-II). Thus, the amount of LC3-II is directly correlated with the number of autophagosomes and is considered as an autophagosome marker. The protein p62/SQTM1, which is specifically degraded

during autophagy, has also been described as a marker of the autophagic flux.

We first investigated whether QSOX1 could regulate autophagy by studying the changes in p62 and LC3-II protein levels in our models during basal and induced autophagy. As shown in Figures 2A and C, overexpression of QSOX1 in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells leads to an increase in p62 levels compared to the levels observed in MCF-7 C cells (1.4 and 1.8 fold, respectively). On the contrary, knock-down of QSOX1 in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells leads to a decrease of p62 levels compared with those observed in MDA-MB-231 shC cells (0.8 and 0.2 fold, respectively) (Figures 2B and D). Moreover, in the MDA-MB-231 shQSOX1-1 and shQSOX1-2 cells, p62 levels could be correlated to QSOX1 mRNA levels in these different cell lines which are decreased of 55% and 92%, respectively [11]. Since it has been shown that p62 transcription can be regulated by different pathways such as the NRF2 pathway during oxidative stress [35], the Ras/MAPK pathway [36] or the JNK/c-Jun pathway [37], we checked whether p62 protein level variations were due to a transcriptional regulation. In our cellular models, no significant changes in p62 mRNA levels were observed (Figures 2E and F), confirming that

the change in p62 protein levels was not due to a transcriptional regulation of the p62 gene but could be attributed to its degradation by the autophagic process. These results suggested that QSOX1 inhibits the autophagic flux. Interestingly, LC3-II protein levels were increased in both our knockdown and overexpression models (**Figures 2A, B, C, D**). Since LC3-II is degraded after autophagolysosome formation, the amount of LC3-II protein is not directly linked to the autophagic flux but rather to the number of autophagosomes at a particular time. An increase in LC3-II protein levels might therefore represent either an increased autophagosome formation or a blockade in autophagosomal maturation and degradation [38].

To study the autophagic flux, we examined the effect of QSOX1 levels variations on autophagic flux by studying p62 and LC3-II levels in the presence or absence of an autophagosome/lysosome fusion inhibitor, bafilomycin A1. In our experiments, bafilomycin A1 led to an increase in p62 and LC3-II levels in

MCF-7 C cells whereas it induced a limited effect on p62 and LC3-II levels in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells (**Figure 3A**). Similarly, after treatment with bafilomycin A1, MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells presented increased p62 and LC3-II levels whereas MDA-MB-231 shC cells displayed only a slight change in these proteins levels (**Figure 3B**). These results indicate that bafilomycin A1 has little effect on p62 and LC3-II levels in cells expressing QSOX1.

Moreover, we quantified the ratio of LC3-II levels in the presence of bafilomycin A1 over LC3-II levels in the absence of bafilomycin A1, a ratio that has been previously used to describe the overall autophagy flux in cells [39]. Our results, shown in **Figures 3C and D**, demonstrated a decreased autophagic flux in the cells expressing QSOX1. Briefly, the LC3-II ratio was lower in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells (2.8 and 1.4, respectively) compared to MCF-7 C cells (6.5) (**Figure 3C**). Similarly, this ratio was higher in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and

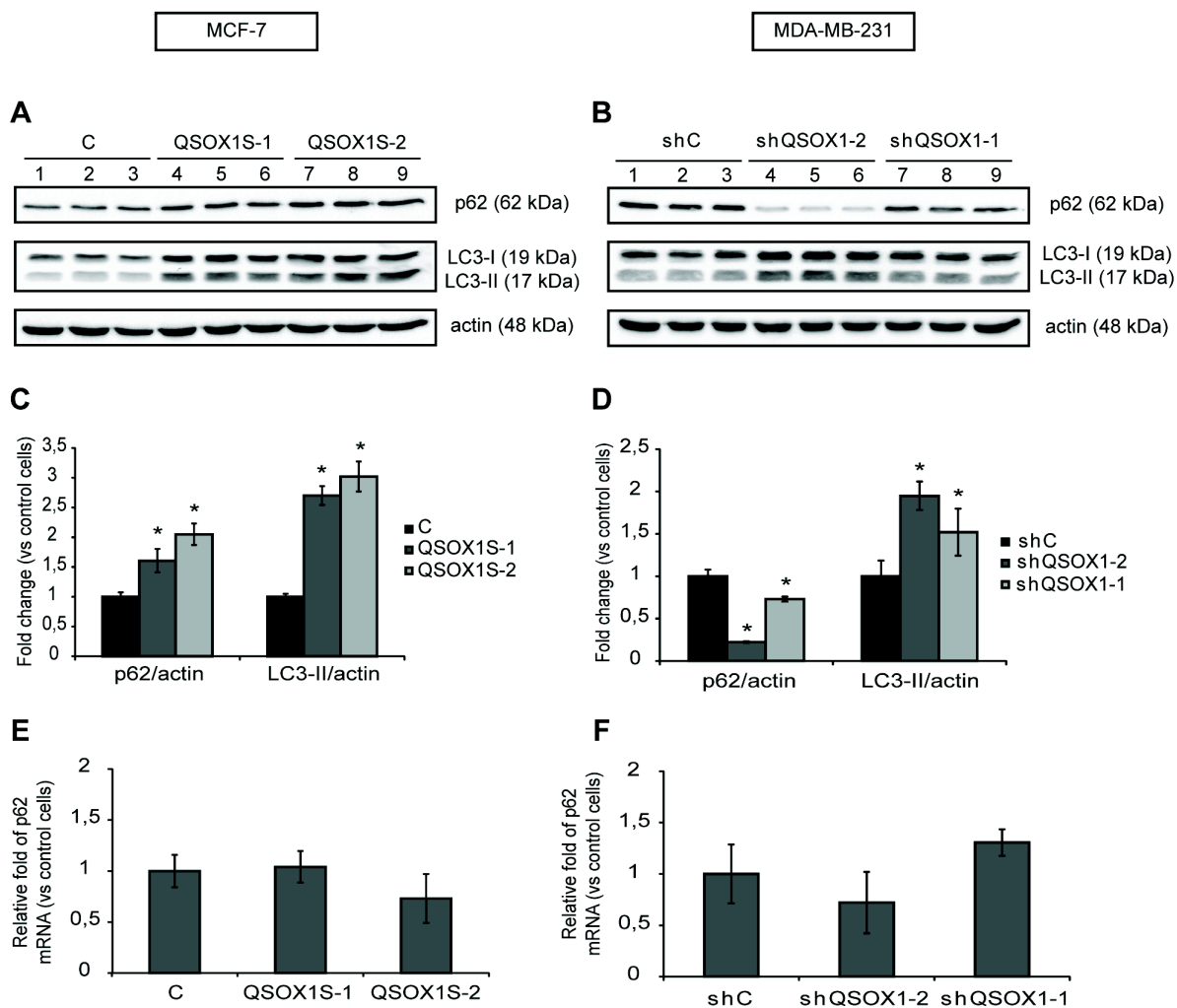


Figure 2. QSOX1 regulates the levels of autophagic markers, p62 and LC3-II. (A) MCF-7 C (lanes 1–3), QSOX1S-1 (lanes 4–6), QSOX1S-2 (lanes 7–9) and (B) MDA-MB-231 shC (lanes 1–3), shQSOX1-2 (lanes 4–6), shQSOX1-1 (lanes 7–9) cells were cultured for 24 h. Cells were then lysed and total proteins (40 μ g) were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-p62, anti-LC3 and anti-actin antibodies. (C and D) p62 and LC3-II levels, observed on the western blot in A and B respectively, were quantified using the Image Lab software. Data are means \pm S.D. of one representative experiment performed in triplicate. * $P < 0.05$ compared to the control. (E and F) After reverse transcription, relative p62 mRNA levels in MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 (E) and MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 (F) cells were determined by qPCR. H3B-2 mRNA was used for normalization. Data are means \pm S.D. of one representative experiment performed in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0086641.g002

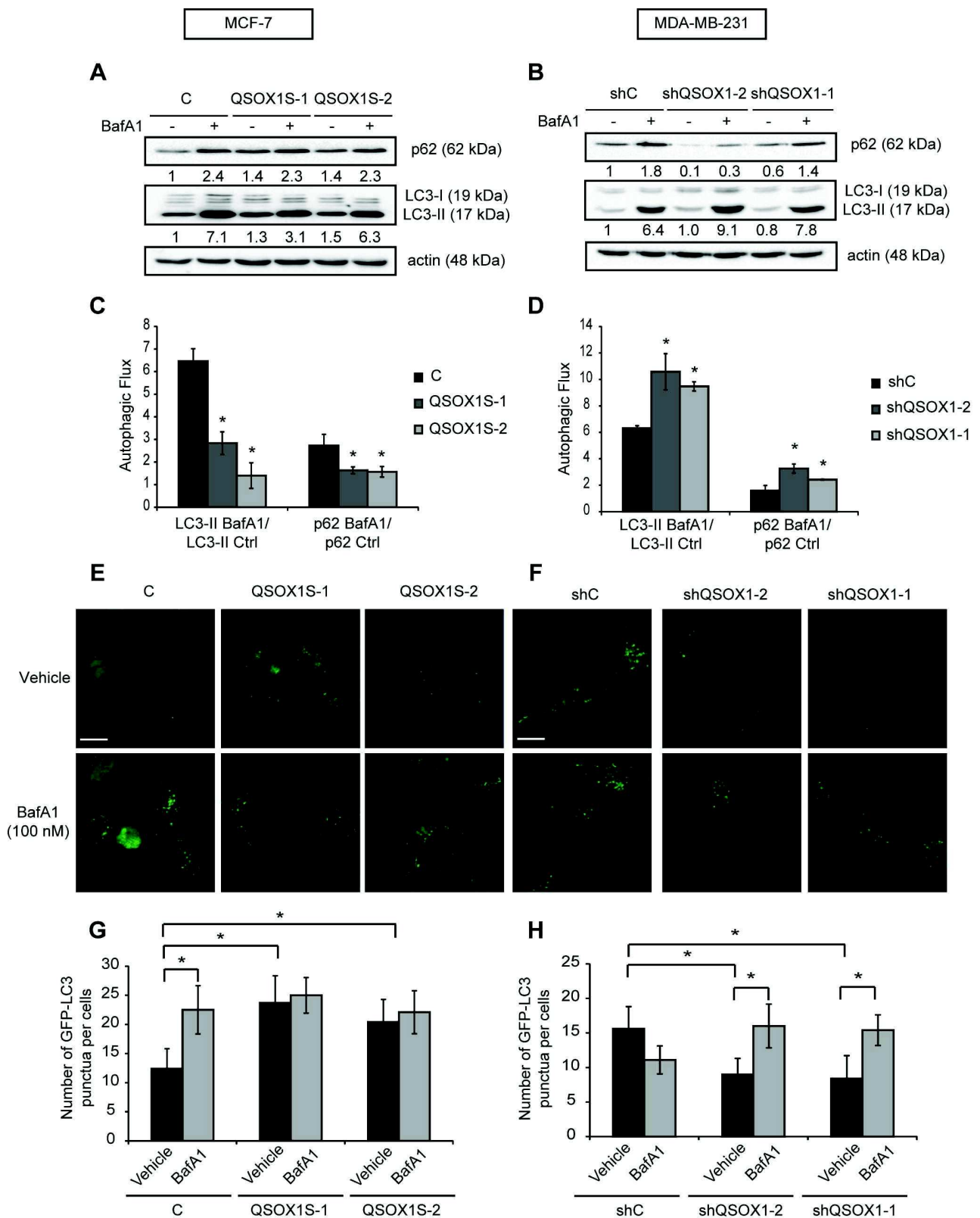


Figure 3. QSOX1 inhibits autophagic flux. (A) MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 and (B) MDA-MB-231 shC, shQSOX1-2, shQSOX1-1 cells were cultured in complete medium with or without 100 nM bafilomycin A1 for 8 h. Cells were then lysed and total proteins (40 µg) were separated on 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-p62, anti-LC3 and anti-actin antibodies. p62 and LC3-II levels were quantified using the Image Lab software. (C and D) The autophagic flux, observed in A and B respectively, was determined as the ratio of LC3-II protein levels in the

presence of bafilomycin A1 versus the levels in the absence of bafilomycin A1. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared to the control. (E) MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 and (F) MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector. 24 h after transfection, cells were incubated with or without 100 nM bafilomycin A1 for 8 h. GFP-LC3 puncta were then analyzed by confocal microscopy. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random. Scale bar represents 20 μ m. (G and H) GFP-LC3 puncta, observed in E and F respectively, were counted using the ImageJ software. For each group, 20 cells were randomly selected. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared to the control. doi:10.1371/journal.pone.0086641.g003

shQSOX1-1 cells (10.6 and 9.5, respectively) compared to MDA-MB-231 shC cells (6.3) (Figure 3D). Moreover, the p62 ratio was also decreased in the cells expressing QSOX1. This ratio was lower in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells (1.6) compared to MCF-7 C cells (2.7) (Figure 3C) and higher in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells (3.3 and 2.4, respectively) compared to MDA-MB-231 shC cells (1.6) (Figure 3D). These results prove that QSOX1 can inhibit the later stages of autophagy.

We then quantified the number of autophagosomes by studying GFP-LC3 fluorescence in our models in the presence or absence of bafilomycin A1. The results, described in the Figures 3E, F, G, H, were consistent with those obtained for LC3-II levels in the western blotting experiments. Indeed, overexpression of QSOX1 in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells enhanced the number of GFP-LC3 puncta per cell compared to MCF-7 C cells (23.7 and 20.4 vs 12.4) (Figures 3E and G). Likewise, knock-down of QSOX1 in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells led to a decrease of GFP-LC3 puncta per cell compared to MDA-MB-231 shC cells (9 and 8.4 vs 15.6) (Figures 3F and H). Moreover, treatment with bafilomycin A1 showed none or a limited effect on the cells expressing QSOX1. In fact, bafilomycin A1 enhanced the number of GFP-LC3 positive vesicles in MCF-7 C cells to those observed in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells whereas this compound did not induce a further accumulation in these models. Similarly, bafilomycin A1 increased GFP-LC3 puncta in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells compared to MDA-MB-231 shC cells. These results confirm that QSOX1, like bafilomycin A1, can inhibit the later stages of autophagy (autophagosome/lysosome fusion or degradation by lysosomal proteases).

QSOX1 Inhibits the Autophagosome/Lysosome Fusion

We next investigated which stage of autophagy was targeted by QSOX1. Functional lysosomes are critical for the maturation of autophagosomes and the degradation of their content. We first examined the effect of QSOX1 on lysosomal acidification using the LysoTracker green marker, a marker of acidic compartments (including lysosomes) in living cells. Our data showed that there is no significant difference in LysoTracker staining in our different cell lines, suggesting that QSOX1 does not affect lysosomal function (Data not shown). To study autophagosome and lysosome fusion, we next examined the colocalization between LysoTracker red and GFP-LC3 fluorescence. Overexpression of QSOX1 in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells led to a decrease of LysoTracker red/GFP-LC3 colocalization compared to MCF-7 C cells (Figures 4A and C). On the other hand, a knock-down of QSOX1 in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells led to an increase of LysoTracker red/GFP-LC3 colocalization compared to the one observed in MDA-MB-231 shC cells (Figures 4B and D). These results confirm that QSOX1 inhibits autophagosome/lysosome fusion. In order to further study the lysosome, we determined the GFP-LC3 colocalization with the lysosomal marker LAMP1. Our data showed that GFP-LC3 colocalized to a lesser extent with LAMP1 in the cells expressing QSOX1

compared to the cells that did not express this protein. Indeed, overexpression of QSOX1 in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells led to a decrease of the LAMP1/GFP-LC3 colocalization (Figures 4E and G) and the knock-down of QSOX1 in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells led to an increase of LAMP1/GFP-LC3 colocalization (Figures 4F and H). Thus, these data confirm that QSOX1 inhibits autophagosome/lysosome fusion.

QSOX1 Function in Cell Invasion is Related to its Role in Autophagy

We have previously shown in our laboratory that QSOX1 decreased breast cancer cell features such as invasion, clonogenicity and proliferation [11]. Moreover, several studies have shown that autophagy can promote cancer cell invasion [33,40]. According to our results described above, which showed that QSOX1 inhibits autophagy, we hypothesized that this protein might inhibit invasion through its function on autophagy. To address this question, the effect of autophagy inhibitors on QSOX1 function in invasion assays was investigated. As previously described [11], overexpression of QSOX1 in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells decreased cell invasion (Figures 5A and C) whereas knock-down of QSOX1 in MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 cells increased this process (Figures 5B and D). After the inhibition of autophagy, using 3-MA or wortmannin, we no longer detected a difference in invasive abilities between the different cell lines expressing or not QSOX1. Indeed, the invasion ability of MCF-7 C cells was decreased to the levels observed in MCF-7 QSOX1S-1 and QSOX1S-2 cells (Figures 5A and C). Similarly, invasion ability of MDA-MB-231 shQSOX1-2 and QSOX1-1 cells were decreased to the levels observed in MDA-MB-231 shC cells (Figures 5B and D). Therefore, we can conclude that the inhibition of autophagy by 3-MA or wortmannin treatment mimics the effect of QSOX1 on cell invasion. These results suggest that QSOX1 might inhibit cancer cell invasion via its function in autophagy.

The Extinction of QSOX1 Expression in Tumors Decreases p62 Levels

We have previously shown that a decreased expression of QSOX1 in subcutaneous mouse xenografts led to a strong enhancement of the tumor growth. Indeed, tumors obtained after inoculation of MDA-MB-231 shQSOX1-1 cells presented a higher volume than those obtained after inoculation of MDA-MB-231 shC cells [11]. Similar results were obtained after inoculation of MDA-MB-231 shQSOX1-2 cells (Figure S1). In order to investigate the effect of QSOX1 on autophagy *in vivo*, we studied whether autophagic marker levels such as LC3 and p62 were altered in these tumors. No significant differences were observed for LC3 levels (data not shown) but, as shown in Figures 6A, B and C, MDA-MB-231 shC tumors exhibited higher levels of p62 puncta per cell and a higher number of p62-positive cells compared to the levels observed in the MDA-MB-231 shQSOX1-2 and shQSOX1-1 tumors. Altogether, these data demonstrate that QSOX1 extinction activates p62 degradation in

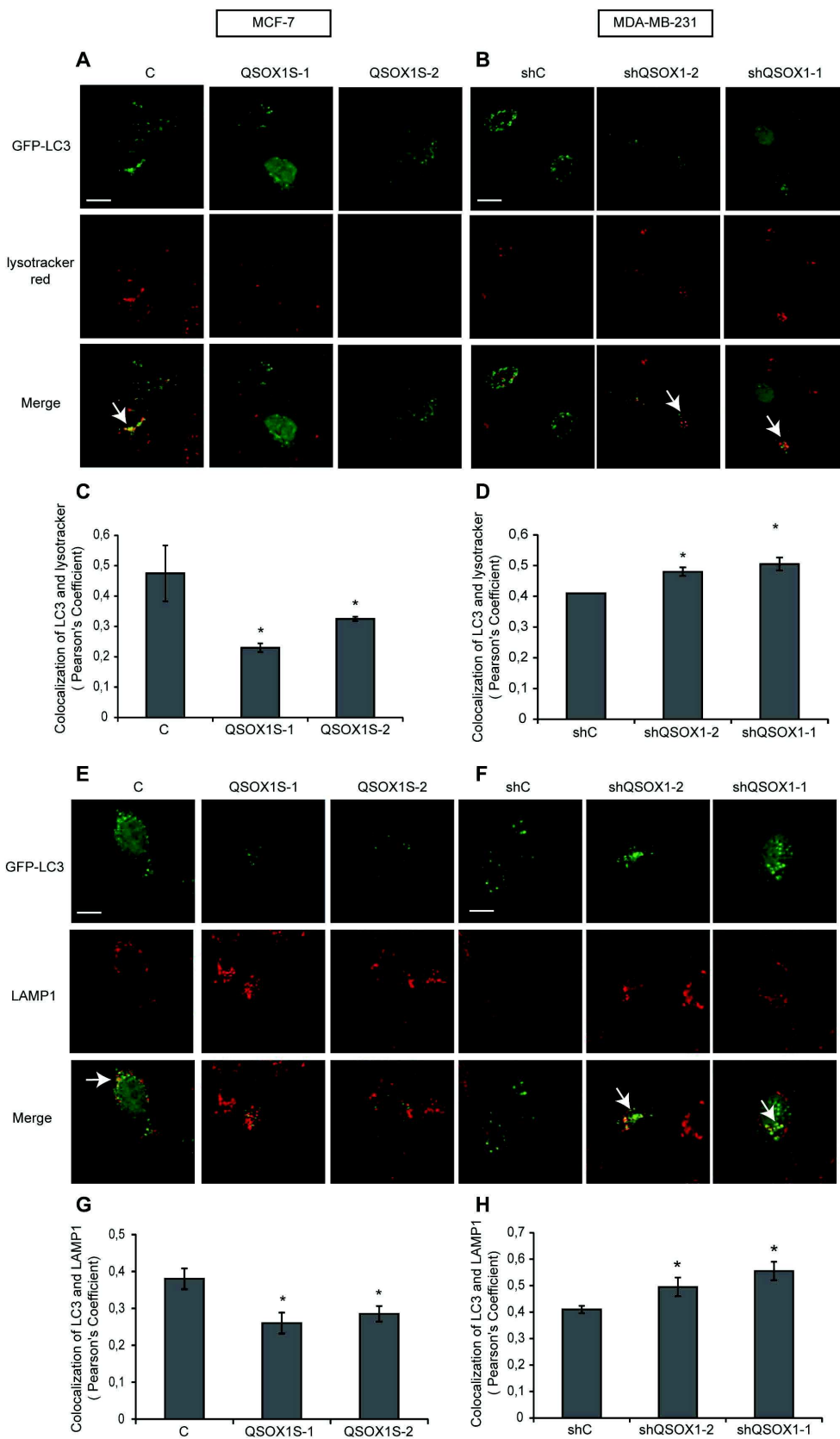


Figure 4. QSOX1 inhibits autophagosome/lysosome fusion. (A) MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 and (B) MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector. 24 h after transfection, cells were incubated in complete medium supplemented with 500 nM LysoTracker red for 1 h. Scale bar represents 10 μ m. (C and D) Colocalization between LysoTracker-stained acidic vesicles and GFP-LC3-positive autophagosomes, observed in A and B respectively, was quantified using a confocal microscope and the Pearson's coefficient using coloc_2 plugin (ImageJ software). The data representative of two independent experiments are shown. *P<0.05 compared to the control. Arrows indicate colocalization. (E) MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 and (F) MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector and then immunostained for LAMP1. Arrows indicate colocalization and Scale bar represents 10 μ m. (G and H) Colocalization of the autophagosome marker GFP-LC3 and the lysosomal marker LAMP1 was analyzed using a confocal microscope and the Pearson's coefficient using coloc_2 (ImageJ software). A representative image of two independent experiments is shown. *P<0.05 compared to the control.
doi:10.1371/journal.pone.0086641.g004

breast tumors. These results are in agreement with those described above at the cellular level and suggest that QSOX1 function in tumor growth *in vivo* could be linked to its inhibiting effect on autophagy.

Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that QSOX1 plays a role in autophagy through the inhibition of autophagosome/lysosome fusion in breast cancer cells.

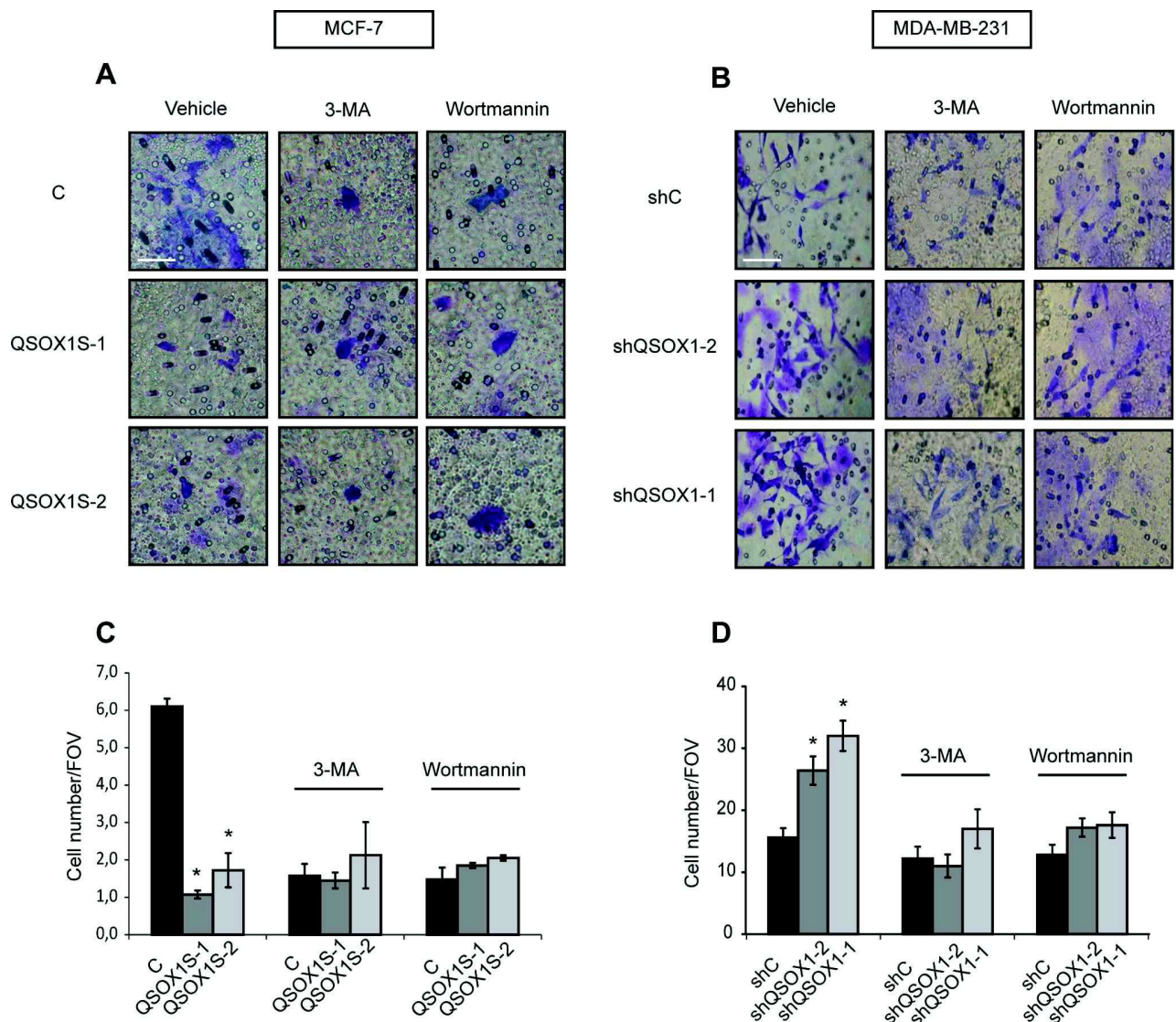


Figure 5. QSOX1 function in cell invasion is related to its role in autophagy. (A) MCF-7 C, QSOX1S-1, QSOX1S-2 and (B) MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1, shQSOX1-2 cells were seeded on polycarbonate filters coated with Matrigel and incubated for 24 h, in the presence or absence of autophagy inhibitors 3-MA (10 mM) or wortmannin (100 nM). Inserts were then stained with a 2% crystal violet solution and photographed. A representative image of ten fields of view (FOV) of each membrane is shown. Scale bar represents 30 μ m. (C and D) 10 FOV were randomly selected and the number of invasive cells, observed in A and B respectively, was determined. Data are means \pm S.D. of two independent experiments performed in duplicate. *P<0.05 compared to the control.
doi:10.1371/journal.pone.0086641.g005

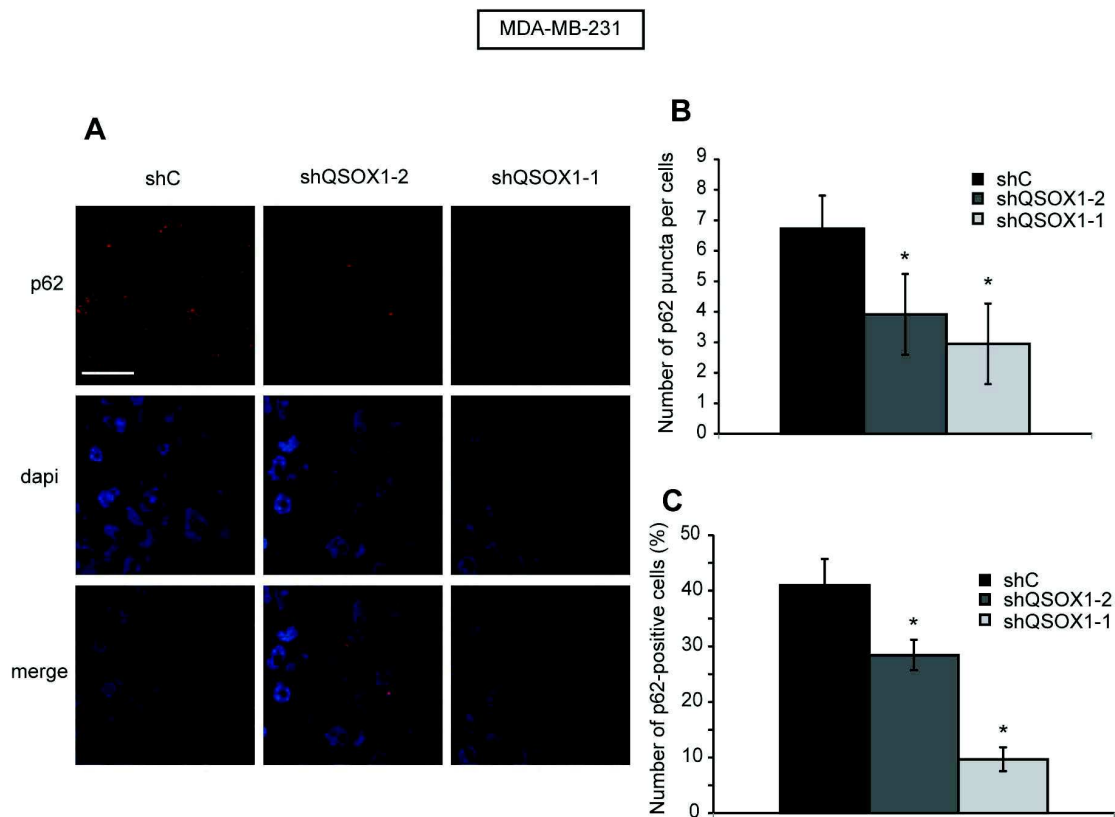


Figure 6. The extinction of QSOX1 expression in tumors is correlated with low levels of p62. (A) Tissue sections of MDA-MB-231 shC, shQSOX1-2 and shQSOX1-1 tumors fixed in formol were subjected to p62 immunostaining. Sections were then analyzed by confocal microscopy and a representative image of 3 independent experiments performed in duplicate is shown. Scale bar represents 30 μ m. (B) The number of p62 puncta per cell and (C) the number of p62-positive cells were determined using the ImageJ software. To determine the number of p62 puncta, 40 cells per tumor were randomly counted. To determine the number of p62-positive cells count, 23 fields were randomly chosen. * $P < 0.05$ compared to the control.

doi:10.1371/journal.pone.0086641.g006

While the enzymatic function of QSOX1 is well described, its biological functions are not fully elucidated. QSOX1 expression is deregulated in cancer cells and this protein has been described to be involved in tumorigenesis. We previously demonstrated that QSOX1 is induced following an oxidative [15] or ER stress (unpublished data), and protects breast cancer cells against a stress-induced cell death. Since autophagy is a stress-regulated mechanism involved in cancer progression, we investigated whether QSOX1 could regulate the autophagic pathway, a regulation that could explain its role during tumor development. To do so, we used two models of breast cancer cell lines: a MCF-7 cell line in which QSOX1 is overexpressed and a MDA-MB-231 cell line in which QSOX1 is extinguished.

During a nutrient stress-induced autophagy, QSOX1 mRNA and protein levels were upregulated and cell survival increased, as it has already been shown for other cellular stresses. Besides its role in homeostasis and cell survival, autophagy can be associated to a non-apoptotic form of cell death called autophagic cell death or type II programmed cell death. Indeed, this type of cell death can occur when autophagy is excessive or when the cells fail to survive against cellular stresses [41,42,43,44]. As such, during an extended amino acid starvation, QSOX1 might prevent excessive autophagy and/or autophagic cell death and allow cell survival by inhibiting this catabolic process. As such, it would be interesting to

focus future experiments on the study of autophagic cell death in our different cell models.

Since QSOX1 is upregulated during autophagy induction, its role in this process was investigated through the study of different autophagic markers. The results regarding p62 degradation suggest that QSOX1 inhibits the basal autophagic flux. The increase in LC3-II protein levels could have represented either an increase of autophagy induction or a decrease of autophagosome degradation. To clarify this point, we compared the ratio of LC3-II in the presence and the absence of the lysosomal inhibitor bafilomycin A1. Our results showed that QSOX1 overexpression leads to an increase in p62 and LC3-II levels and an increase in the number of GFP-LC3 puncta in breast cancer cells. More interestingly, bafilomycin A1, which is an autophagosome/lysosome fusion inhibitor, had a limited effect on autophagic flux in cells overexpressing QSOX1. We also observed that QSOX1 prevents the colocalization of GFP-LC3 (an autophagosome marker) and LysoTracker (a marker of acidic vesicles) or LAMP1 (a lysosomal marker) staining, suggesting that this protein inhibits the autophagosome/lysosome fusion. These results are consistent with those obtained in a genome-wide human siRNA screen targeting more than 20 000 genes, suggesting that the knock-down of QSOX1 leads to an increase of GFP-LC3 puncta in the absence, but not in the presence of a lysosomal protease inhibitor (E64d) in neuroblastoma cells [45].

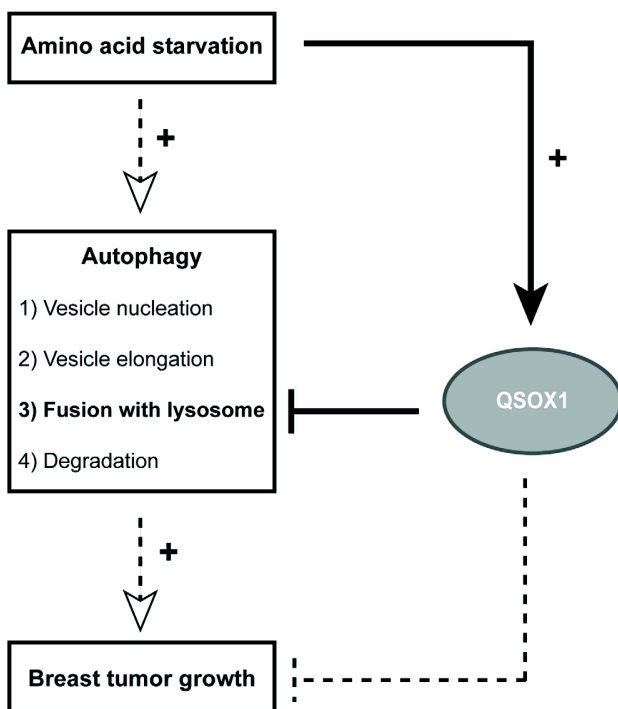


Figure 7. QSOX1 functions in breast cancer cells. Our results demonstrate that QSOX1 expression is induced following a nutrient stress-induced autophagy. QSOX1 also inhibits autophagy through the inhibition of autophagosome/lysosome fusion and its inhibitory effect on autophagy could explain its function in breast cancer cell invasion and tumor growth. Dotted arrows and lines represent data which have already been described whereas solid arrows and lines represent results obtained in our study. doi:10.1371/journal.pone.0086641.g007

The mechanism by which QSOX1 inhibits autophagy remains to be determined. One of the potential QSOX1 interacting proteins is Ubiquilin4 (UBQLN4), a protein which belongs to the Ubiquilin family involved in the autophagic process [46]. Indeed, it has recently been shown that UBQLN4 acts together with UBQLN1 to induce autophagosome/lysosome fusion through mediated interaction of UBQLN1 with the autophagic machinery [47,48]. QSOX1, through its interaction with UBQLN4, could inhibit the autophagosome/lysosome fusion. Moreover, a genome-wide targeting more than 200 genes has shown that QSOX1 (QSCN6) could inhibit autophagy in human neuroblastoma cells by negatively regulating PI3K activity [49]. These results suggest that QSOX1 could inhibit autophagosome/lysosome fusion by interfering with the formation of the complex between UV radiation resistance-associated gene (UVRAG), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and Beclin1.

Several previous studies have shown an involvement of QSOX1 in cancer. However, the role of QSOX1 seems to be complex mainly because of the existence of its different transcripts. Indeed, expression of QSOX1 spliced variants present differential expression patterns depending on the type of cancer and the specific role of these different transcripts remain elusive. Consequently, QSOX1 has been correlated to a good or a poor prognosis according to the type of cancer studied and could promote or reduce cancer cell phenotypes according to the tumor type or grade [1,11,12,13,14,15,16,17,18].

Autophagy also plays a role in various cancers such as breast cancer. This process has a “double-edged sword” role in cancer

depending on the cell type, the context or the stage of tumor development [50,51,52]. As such, we wondered whether the involvement of QSOX1 in autophagy might explain its function in tumor progression. Our results suggest that QSOX1, through the inhibition of autophagy, reduces cell invasion. To confirm this hypothesis, it will be necessary to genetically inhibit autophagy using siRNAs against ATG5 or ATG7 and study the effect of this inhibition on QSOX1 function in invasion. These results also highlight that autophagy plays a prosurvival role in our cellular models as previously described in pancreatic or mammary tumorigenesis [53,54,55].

It has previously been shown in our laboratory that QSOX1 inhibits tumor growth *in vivo* [11]. Indeed, tumors obtained after inoculation of MDA-MB-231 shQSOX1 cells in NOG mice presented a higher volume than those obtained after inoculation of MDA-MB-231 shC cells. In order to determine whether these differences could be related to a deregulation of autophagy, we investigated the expression of autophagic markers (p62 and LC3-II) in these tumors. Our data showed no significant differences for LC3 levels between shC and shQSOX1 tumors (Data not shown) but the presence of QSOX1 in control tumors was associated with high levels of p62. These results are in agreement with those observed in our cellular models and suggest that QSOX1 plays a role during tumor growth *in vivo* and that this effect could be linked to its inhibitory effect on autophagy. However, tumors-induced by MDA-MB-231 shQSOX1-2 cells, which present 92% of QSOX1 extinction, did not present a greater decrease of p62 levels compared to tumors-induced by MDA-MB-231 shQSOX1-1 cells which present 55% of QSOX1 extinction, as expected in regard to the results obtained *in vitro* with the two cell lines. Previous results have already demonstrated that tumors obtained after inoculation of MDA-MB-231 shQSOX1-1 [11] and shQSOX1-2 (Figure S1) cells show similar growth despite their difference in the level of QSOX1 extinction. This observation could be explained by the fact that a tumor tissue is far more complex and heterogeneous than a cell line *in vitro*. Moreover, p62 is a multi-domain protein that interacts with the autophagic machinery and plays a role in various signaling pathways such as antioxidant response, inflammation, metabolism and cancer [56], we still cannot exclude that the high p62 levels observed in tumors expressing QSOX1 might not only be related to the deregulation of autophagy. Moreover, our results are consistent with those previously reported describing a pro-survival role of autophagy during tumor establishment and progression [33,57].

Altogether, our results demonstrate that QSOX1 inhibits the autophagic pathway through the inhibition of autophagosome/lysosome fusion and that its inhibitory effect on autophagy might explain its function in cancer cell invasion and tumor growth (Figure 7).

Supporting Information

Figure S1 Decreased expression of QSOX1 led to a strong increase in tumor growth. MDA-MB-231 shC, shQSOX1-1 and shQSOX1-2 cells were injected subcutaneously in CIEA NOG mice (n = 5 per group). (A) 21 days after injection, the evolution of the tumor volume was measured twice a week. The tumor volume was calculated using the formula: $V = \frac{1}{2} a \times b^2$, where a is the longest tumor axis, and b is the shortest tumor axis. (B) 42 days after injection, tumors were fixed in formol and photographed. * P<0.05, compared to the control. This experiment is representative of two independent experiments. (TIF)

Acknowledgments

We thank Pierre-Yves Rysold for his help and advices during immunofluorescence experiments and Nicole Jaclyn Le Grand for critical reading of the paper. We thank Francis Bonnefoy for CIEA NOG Mice breeding and Jean-René Pallandre for mice tumors establishment. Authors are grateful to Sophie Launay for their technical help (Plateau technique Imagerie Cellulaire et Tissulaire, SFR4234, Besançon). We thank Dr. Elazar for kindly providing the pGFP-LC3 vector.

References

- Musard JF, Sallot M, Dulieu P, Fraichard A, Ordener C, et al. (2001) Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 83–91.
- Thorpe C, Hooper KL, Raje S, Glynn NM, Burnside J, et al. (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* 405: 1–12.
- Heckler EJ, Rancy PC, Kodali VK, Thorpe C (2008) Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1783: 567–577.
- Tury A, Mairet-Coello G, Poncet F, Jacquemard C, Risold PY, et al. (2004) QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens. *J Endocrinol* 183: 353–363.
- Benayoun B, Esnard-Fève A, Castella S, Courty Y, Esnard F (2001) Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. *J Biol Chem* 276: 13830–13837.
- Hooper KL, Joneja B, White HB, 3rd, Thorpe C (1996) A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem* 271: 30510–30516.
- Ilani T, Alon A, Grossman I, Horowitz B, Kartvelishvili E, et al. (2013) A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. *Science* 341: 74–76.
- Song H, Zhang B, Watson MA, Humphrey PA, Lim H, et al. (2009) Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene* 28: 3307–3319.
- Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Katchman BA, Decker GA, et al. (2009) Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. *J Proteome Res* 8: 4722–4731.
- Hellebrekers DM, Castermans K, Viré E, Dings RP, Hoebers NT, et al. (2006) Epigenetic regulation of tumor endothelial cell anergy: silencing of intercellular adhesion molecule-1 by histone modifications. *Cancer Res* 66: 10770–10777.
- Pernodet N, Hermetet F, Adami P, Vejux A, Descotes F, et al. (2012) High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 14: R136.
- Hellebrekers DM, Melotte V, Viré E, Langenkamp E, Molema G, et al. (2007) Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Res* 67: 4138–4148.
- Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S (1993) Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ* 4: 483–493.
- Coppock D, Kopman C, Gudas J, Cina-Poppe DA (2000) Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 604–610.
- Morel C, Adami P, Musard JF, Duval D, Radom J, et al. (2007) Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 313: 3971–3982.
- Katchman BA, Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Watanabe A, et al. (2011) Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. *Mol Cancer Res* 9: 1621–1631.
- Katchman BA, Ocal IT, Cunliffe HE, Chang YH, Hostetter G, et al. (2013) Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. *Breast Cancer Res* 15: R28.
- Soloviev M, Esteves MP, Amiri F, Crompton MR, Rider CC (2013) Elevated transcription of the gene QSOX1 encoding quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. *PLoS One* 8: e57327.
- Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tadmair E, Maiuri MC, et al. (2008) To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med* 8: 78–91.
- Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14: 70–77.
- Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102–1109.
- Zhou S, Zhao L, Kuang M, Zhang B, Liang Z, et al. (2012) Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett* 323: 115–127.
- Liu EY, Ryan KM (2012) Autophagy and cancer—issues we need to digest. *J Cell Sci* 125: 2349–2358.
- Lozy F, Karantzis V (2012) Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 23: 395–401.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GD. Performed the experiments: LP NP. Analyzed the data: LP MBG MJ RDM PA GD. Contributed reagents/materials/analysis tools: CB. Wrote the paper: LP MBG MJ RDM GD.

- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, et al. (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 21: 1367–1381.
- Karantzis V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, et al. (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 21: 1621–1635.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672–676.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaan D, et al. (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8: 688–699.
- Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, et al. (2009) Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* 217: 702–706.
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, et al. (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 59: 59–65.
- Harris AL (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2: 38–47.
- Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J (2011) Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 21: 67–72.
- Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W, et al. (2011) Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 25: 1510–1527.
- Haan C, Behrmann I (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 318: 11–19.
- Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, et al. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 285: 22576–22591.
- Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, et al. (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF- κ B mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13: 343–354.
- Puissant A, Auberger P (2010) AMPK- and p62/SQSTM1-dependent autophagy mediate resveratrol-induced cell death in chronic myelogenous leukemia. *Autophagy* 6: 655–657.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445–544.
- Arduino DM, Esteves AR, Cortes L, Silva DF, Patel B, et al. (2012) Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. *Hum Mol Genet* 21: 4680–4702.
- Macintosh RL, Timpson P, Thorburn J, Anderson KI, Thorburn A, et al. (2012) Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle* 11: 2022–2029.
- Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, Ozpolat B (2010) Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* 6: 322–329.
- Clarke R, Cook KL, Hu R, Facey CO, Tavassoly I, et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Cancer Res* 72: 1321–1331.
- Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115: 2679–2688.
- Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 1004–1010.
- Lipinski MM, Hoffman G, Ng A, Zhou W, Py BF, et al. (2010) A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Dev Cell* 18: 1041–1052.
- Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, et al. (2006) A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 125: 801–814.
- N'Diaye EN, Debnath J, Brown EJ (2009) Ubiquitins accelerate autophagosome maturation and promote cell survival during nutrient starvation. *Autophagy* 5: 573–575.
- Yun Lee D, Arnott D, Brown EJ (2013) Ubiquitin4 is an adaptor protein that recruits Ubiquitin1 to the autophagy machinery. *EMBO Rep* 14: 373–381.

49. Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, et al. (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14164–14169.
50. Berardi DE, Campodonico PB, Diaz Bessone MI, Urtreger AJ, Todaro LB (2011) Autophagy: friend or foe in breast cancer development, progression, and treatment. *Int J Breast Cancer* 2011: 595092.
51. Debnath J (2011) The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 173–187.
52. Karantza-Wadsworth V, White E (2007) Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy* 3: 610–613.
53. Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, et al. (2013) Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* 32: 2261–2272.
54. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, et al. (2011) Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 25: 717–729.
55. Amaravadi RK (2012) Autophagy and tumor cell invasion. *Cell Cycle* 11: 3718–3719.
56. Puissant A, Fenouille N, Auburger P (2012) When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res* 2: 397–413.
57. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2009) Assessing metabolic stress and autophagy status in epithelial tumors. *Methods Enzymol* 453: 53–81.

II. ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE GABARAPL1 DANS L'AUTOPHAGIE ET LE CANCER DU SEIN

Le gène *GABARAPL1*, identifié au sein de notre laboratoire comme étant régulé positivement par les estrogènes, code une protéine de 117 acides aminés (Pellerin *et al.*, 1993; Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Cette protéine a d'abord été identifiée comme interagissant avec la tubuline et la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA_A suggérant l'implication de GABARAPL1 dans le transport du récepteur GABA_A (Mansuy *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été mis en évidence que la protéine GABARAPL1 appartient à la famille ATG8 et sous-famille GABARAP dont les membres sont impliqués dans l'autophagie (Xin *et al.*, 2001). L'ensemble des membres de cette famille possède une glycine en position 116 conservée, nécessaire à leur rôle dans l'autophagie (Le Grand *et al.*, 2011a). Il a été mis en évidence au sein de notre laboratoire que GABARAPL1, comme les autres membres de la famille ATG8, est associée aux vésicules autophagiques. En effet, lors de l'autophagie, GABARAPL1 est clivée par la protéase ATG4B en aval de son résidu glycine puis conjuguée à un phospholipide au niveau des autophagosomes (Chakrama *et al.*, 2010). Une étude a suggéré que les membres de la famille GABARAP interviendraient dans les étapes tardives de la maturation des autophagosomes (Weidberg *et al.*, 2010). Par son interaction avec des adaptateurs tels que p62, NBR1 et NIX, la protéine GABARAPL1 pourrait également participer à l'autophagie sélective permettant ainsi la dégradation des agrégats protéiques ubiquitinylés et des mitochondries endommagées (Kirkin *et al.*, 2009b; Novak *et al.*, 2010; Pankiv *et al.*, 2007). GABARAPL1 interagit également avec STBD1 pour permettre la dégradation du glycogène par autophagie, plus particulièrement appelée dans ce cas glycophagie, suggérant une fonction de GABARAPL1 dans le métabolisme (Jiang *et al.*, 2010b; Jiang *et al.*, 2011).

La protéine GABARAPL1 a aussi été associée au cancer. Une perte de l'expression de *GABARAPL1* a été mise en évidence dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus sains (Nemos *et al.*, 2003). Des études réalisées au sein de notre laboratoire ont également permis d'associer l'expression de *GABARAPL1* à un facteur de bon pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein (Berthier *et al.*, 2010). De plus, la surexpression de GABARAPL1 dans des cellules de cancer du sein conduit à une inhibition de la prolifération *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* (Berthier *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été obtenus dans les carcinomes hépatocellulaires (Liu *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi un rôle suppresseur de tumeur de GABARAPL1.

Etant donné l'implication de GABARAPL1 dans la dégradation du glycogène et des mitochondries endommagées, nous avons voulu dans un premier temps vérifier l'hypothèse selon laquelle GABARAPL1 serait impliquée dans le métabolisme cellulaire et plus particulièrement dans la production d'énergie qui pourrait expliquer sa fonction dans le cancer. L'ensemble de cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr. Jianhua Zhang (Birmingham, AL, USA) à partir d'un modèle d'extinction de GABARAPL1 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-436. Les résultats de notre étude ont permis de montrer que :

- **L'extinction de GABARAPL1 augmente la prolifération, la capacité à former des colonies et l'invasion des cellules MDA-MB-436 confirmant ainsi son rôle de suppresseur de tumeur.**
- **L'extinction de GABARAPL1 inhibe le flux autophagique et diminue le nombre de lysosomes.**
- **Cette inhibition de l'autophagie conduit à une augmentation du nombre de mitochondries et du taux d'ADN mitochondrial endommagé.**
- **Le nombre plus élevé de mitochondries augmente l'activité métabolique qui se manifeste par une augmentation de la consommation d'oxygène, du taux d'ATP et du taux de glutathion.**

L'ensemble de ces résultats est présenté dans la **Publication II**.

Dans un second temps, au vu du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie et le cancer, deux mécanismes étroitement liés, nous avons voulu approfondir le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie et l'implication de ce processus dans les fonctions de GABARAPL1 liées aux cellules cancéreuses. L'ensemble de cette étude a été réalisé à partir d'un modèle de surexpression de GABARAPL1 et de son mutant GABARAPL1 G116A dans les cellules de cancer du sein MCF-7. Ce mutant possède une alanine en position 116 qui remplace la glycine, nécessaire à la localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes. Les résultats de notre étude ont permis de montrer que :

- **La mutation G116A empêche la lipidation de GABARAPL1 et sa localisation aux autophagosomes sans perturber d'autres caractéristiques de cette protéine.**
- **La localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes est nécessaire à son rôle lors de l'autophagie induite mais pas lors de l'autophagie basale.**
- **Le rôle de GABARAPL1 lors des étapes tardives de l'autophagie requiert sa localisation au niveau des autophagosomes.**
- **GABARAPL1 a également un rôle au niveau des étapes précoces de l'autophagie mais indépendamment de sa localisation au niveau des autophagosomes.**

- Le rôle de GABARAPL1 sur les phénotypes cancéreux *in vitro* peut être dépendant et indépendant de sa localisation au niveau des autophagosomes.
- Le rôle de GABARAPL1 sur la croissance tumorale *in vivo* est indépendant de sa localisation au niveau des autophagosomes.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans la **Publication III**.

Publication II:

The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells

Michaël Boyer-Guittaut, **Laura Poillet**, Qiuli Liang, Elodie Bôle-Richard, Xiaosen Ouyang, Gloria A Benavides, Fatima-Zahra Chakrama, Annick Fraichard, Victor M Darley-Usmar, Gilles Despouy, Michèle Jouvenot, Régis Delage-Mourroux, and Jianhua Zhang.

Autophagy (2014)

The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells

Michaël Boyer-Guittaut,^{1,2,3,*} Laura Poillet,¹ Qiuli Liang,^{2,3} Elodie Bôle-Richard,^{1,†} Xiaosen Ouyang,^{2,3,4} Gloria A Benavides,^{2,3} Fatima-Zahra Chakrama,^{1,‡} Annick Fraichard,¹ Victor M Darley-Usmar,^{2,3} Gilles Despouy,¹ Michèle Jouvenot,¹ Régis Delage-Mourroux,¹ and Jianhua Zhang^{2,3,4,*}

¹Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie; EA3922 Estrogènes; Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central; Sciences et Techniques; Besançon, France; ²Department of Pathology; University of Alabama at Birmingham; Birmingham, AL USA; ³Center for Free Radical Biology; University of Alabama at Birmingham; Birmingham, AL USA; ⁴Department of Veterans Affairs; Birmingham VA Medical Center; Birmingham, AL USA

Current affiliation: [†]EFS B/F-C; INSERM; Interactions Hôte-Greffon-Tumeurs & Ingénierie Cellulaire et Génique; Besançon, France; [‡]Université de Lyon; Inserm U1052; Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon; Centre Léon Bérard; Lyon, France

Keywords: autophagy, breast cancer, GABARAP, GABARAPL1, GEC1, LAMP1, LC3, lysosome, MDA-MB-436, mitochondria, mitophagy

Abbreviations: ATG, autophagy-related; CQ, chloroquine; BafA1, bafilomycin A₁; DNM1L/Drp1, dynamin 1-like; ECAR, extracellular acidification rate; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; GABA, gamma-aminobutyric acid; GABA_AR, gamma-aminobutyric acid type A receptor; GABARAP, GABA(A)receptor-associated protein; GABARAPL1/GEC1, GABA(A) receptor-associated protein like 1; GABARAPL2/GATE-16, GABA(A) receptor-associated protein-like 2; GFP, green fluorescent protein; GSH, glutathione; HNE, 4-hydroxynonenal; KD, knockdown; MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; MFN1, mitofusin 1; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NBR1, neighbor of BRCA1 gene 1; OCR, oxygen consumption rate; PBS, phosphate-buffered saline; PBS-T, PBS-Triton-X; PFA, paraformaldehyde; PPARGC1A, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1alpha; PINK1, PTEN-induced putative kinase 1; PVDF, polyvinylidenedifluoride; RCR, respiratory control ratio; SDS, sodium dodecylsulfate; SQSTM1/p62, sequestosome 1; TBS-T, Tris buffered saline-Tween; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate; VDAC1, voltage-dependent anion channel 1; WT, wild type

GABARAPL1/GEC1 is an early estrogen induced gene which encodes a protein highly conserved from *C. elegans* to humans. Overexpressed GABARAPL1 interacts with GABA_A or kappa opioid receptors, associates with autophagic vesicles, and inhibits breast cancer cell proliferation. However, the function of endogenous GABARAPL1 has not been extensively studied. We hypothesized that GABARAPL1 is required for maintaining normal autophagic flux, and plays an important role in regulating cellular bioenergetics and metabolism. To test this hypothesis, we knocked down *GABARAPL1* expression in the breast cancer MDA-MB-436 cell line by shRNA. Decreased expression of GABARAPL1 activated pro-cancer responses of the MDA-MB-436 cells including increased proliferation, colony formation, and invasion. In addition, cells with decreased expression of GABARAPL1 exhibited attenuated autophagic flux and a decreased number of lysosomes. Moreover, decreased GABARAPL1 expression led to cellular bioenergetic changes including increased basal oxygen consumption rate, increased intracellular ATP, increased total glutathione, and an accumulation of damaged mitochondria. Taken together, our results demonstrate that GABARAPL1 plays an important role in cell proliferation, invasion, and autophagic flux, as well as in mitochondrial homeostasis and cellular metabolic programs.

Introduction

The *GABARAPL1/GEC1* (GABA[A] receptor-associated protein like 1) gene was discovered during the search for new early estrogen-induced genes in a model of guinea-pig glandular

epithelial cells.¹ The encoded protein is conserved throughout evolution from *C. elegans* to humans, with 100% identical protein sequence from yeast to mammals.² This protein also shares a high degree of homology with the GABARAP protein, which expresses a new GABA_A receptor-associated protein.³ The 2

*Correspondence to: Jianhua Zhang; Email: zhanja@uab.edu; Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr
Submitted: 01/17/2013; Revised: 02/18/2014; Accepted: 02/28/2014
<http://dx.doi.org/10.4161/auto.28390>

proteins share 87% sequence identity, a common tridimensional structure similar to the one described for ubiquitin,⁴ and serve a similar function in GABA_A receptor transport.⁵ In addition, GEC1 was shown to interact with tubulin and promote tubulin assembly and microtubule bundling in vitro.⁵ GEC1 was later renamed GABARAPL1. The role of GABARAPL1 in the transport of receptors is not restricted to the GABA_A receptor since it interacts with human OPRK1 (opioid receptor, kappa 1) and enhances its trafficking to the plasma membrane.⁶

In rodents, *GABARAPL1* is highly expressed in the brain, and restricted to neurons.⁷⁻⁹ In muscle or cardiomyocytes, it is activated after glucose deprivation, oxidative stress or ultra-endurance exercise.^{10,11} In most tumor cell lines or cancer tissues tested, *GABARAPL1* expression is lower than noncancerous tissues or cells.^{12,13} Inhibition of *GABARAPL1* expression has also been observed in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients,^{14,15} in the skeletal muscle of patients presenting an upper motor neuron lesion¹⁵ or in the substantia nigra of Parkinson disease patients.¹⁶ Whether the changes of *GABARAPL1* expression are contributing to the disease pathogenesis or compensatory responses to various pathological conditions is currently unclear.

Recently, we have demonstrated that GABARAPL1, like GABARAP, can associate with autophagic vesicles and is involved in the autophagy process.² The autophagy pathway is a cellular degradation pathway involved in the degradation of long-lived proteins and organelles.¹⁷⁻²¹ This is in contrast to the proteasome pathway which is involved in the specific degradation of ubiquitinated short-lived proteins.²² Autophagy requires more than 30 Atg8-related (ATG) proteins, and the regulated formation of a double-membrane structure known as the phagophore. Following its initiation, this structure elongates and engulfs part of the cytoplasm containing organelles, aggregates or soluble proteins, to form a closed vesicle called the autophagosome. This vesicle will later fuse with the lysosomes, to form an autolysosome, and induce the degradation of its content, a process that is involved in maintaining mitochondrial quality and in the responses to oxidative stress.²³⁻²⁵ The initiation and the elongation of this structure requires several ATG proteins, including orthologs of yeast Atg8, which are conjugated to phospholipids of the elongating double-membrane structure via a cycle similar to the one described for the ubiquitination of proteins.²² These Atg8 orthologs are divided into 2 subfamilies: the MAP1LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) family, usually abbreviated as LC3, and the GABARAP family which together comprises LC3A, B, B2 and C and GABARAP, GABARAPL1, and GABARAPL2, respectively. These proteins were initially thought to serve redundant functions in the formation of the autophagosome.

Recent studies have shown that in HeLa cells, the proteins of the LC3 family are indispensable for the elongation of the double-membrane structure while the GABARAP family members are required for the late maturation of the autophagosomes.²⁶ In the course of these experiments, siRNA directed against each of the 7 *ATG8* orthologs inhibited SQSTM1/p62 degradation. However, cross-regulation among individual siRNAs was not examined. Out of the 7 *ATG8* family genes, *Lc3b* and *Gabarap*

genes have been knocked out in mice. Mice with disruption of the *Gabarap* or the *Lc3b* gene alone are viable and without an apparent change in phenotype.^{27,28} It is noteworthy that, alterations of the autophagy pathway have not been reported with the *Gabarap* knockout mice. The fact that these animals are viable, fertile, and do not exhibit any noticeable phenotype is in favor of the redundancy theory. Recent studies, however, have shown that *Lc3b* KO mice exhibited decreased autophagic vesicles in the lung after chronic exposure to cigarette smoke, suggesting that in response to a specific stimulus, individual *ATG8* ortholog genes may play important and distinct roles in autophagy.²⁹

Consistent with these observations, one recent hypothesis to explain the high number of Atg8 orthologs in mammals is their possible involvement in different types of selective autophagy (e.g., aggrephagy, mitophagy, pexophagy, ribophagy, or xenophagy).³⁰ Adaptor proteins, such as SQSTM1, NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1), and BNIP3L/NIX, interact with ubiquitinated aggregates or organelles via their ubiquitin associated domains and recruit cargos to the autophagosomes by interacting with different ATG8 members via their LC3-interacting region (W/YxxL/I). Several studies have indicated that the distinct Atg8 family members have different affinities for the specific cargos and therefore might be the missing link to explain the selectivity of the autophagy process. For example, it has been shown that all Atg8 members can bind BNIP3L in vitro but only GABARAPL1 is preferentially recruited to damaged mitochondria in a BNIP3L-dependent manner in cells treated with the mitochondrial uncoupler CCCP.³¹ Another study showed that GABARAPL1 can specifically bind to STBD1 (starch-binding domain 1)/genethonin1 and induce glycogen degradation by autophagy in a process now known as glycophagy.³² This process is also dependent on the STBD1 LC3-interacting region and seems to be specific to GABARAPL1.³³ A third study recently demonstrated that GABARAPL1 inhibits Wnt-CTNNB1/ β -catenin signaling in MCF-7 cells via the selective degradation of DVL2 (dishevelled segment polarity protein 2), an activator of the WNT-CTNNB1 pathway.³⁴ In addition, overexpression of GABARAPL1 inhibits MCF-7 cell proliferation and the formation of tumors in nude mice.³⁴ Whether the role of GABARAPL1 in regulating cell proliferation and tumor formation is linked to the degradation of DVL2 or the autophagy pathway has not been determined. These observations suggest that different Atg8 members may be involved in selective autophagy processes linked to the degradation of specific cargos, occurring in distinct cell types or tissues or in response to different stressors.

Since GABARAPL1 is involved in glycogen degradation, relocates to damaged mitochondria and interacts with BNIP3L, we hypothesized that GABARAPL1 may play an essential role in cell metabolism and in particular in energy production. This function may also explain the fact that overexpression of this protein inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation and tumor formation.^{13,34} Indeed, it is known that highly proliferating breast cancer cells need increased levels of ATP and that tumor formation requires an active autophagy pathway to survive under hypoxic and oxidative stress before the vascularization of a solid tumor.³⁵

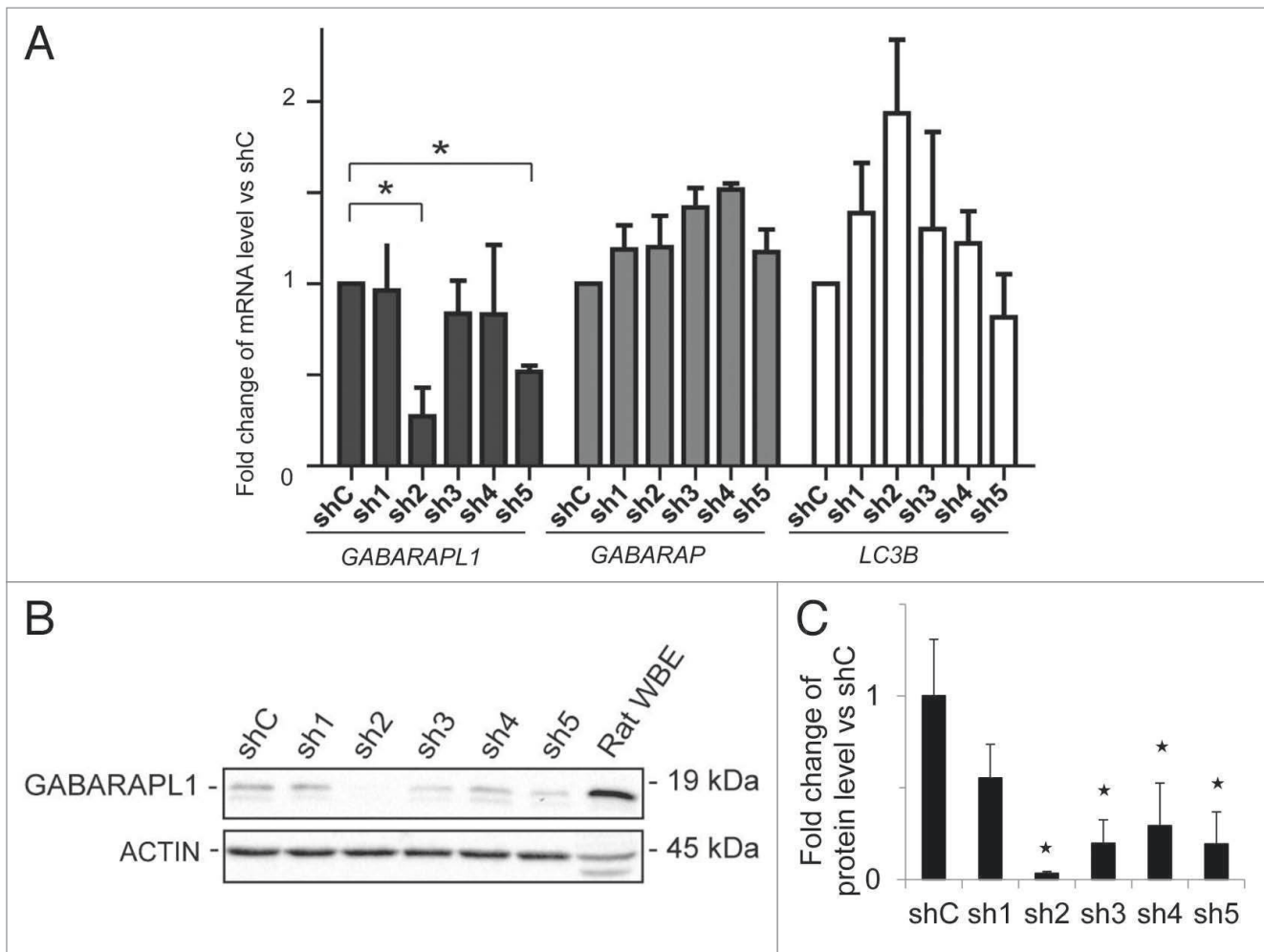


Figure 1. *GABARAPL1* mRNA and protein expression are significantly decreased in the MDA-MB-436-sh2 clone. (A) *GABARAPL1*, *GABARAP*, and *LC3B* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in the different MDA-MB-436 stable cell lines. The different stable cell lines, expressing 1 of the 5shRNAs directed against the *GABARAPL1* gene (sh1 to sh5), were compared with the stable MDA-MB-436 cell line expressing a control shRNA (shC). * $P < 0.05$, vs shC (n = 3). (B) *GABARAPL1* expression levels in the MDA-MB-436 stable cell lines were determined by western blotting. Total proteins (40 μ g) were separated on a 15% SDS-PAGE gel and immunoblotted using anti-*GABARAPL1* and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. Rat whole brain extract (WBE) was used as a positive control of *GABARAPL1* expression. (C) Quantification of the signals observed on the western blot in (B). * $P < 0.05$, vs shC (n = 3).

In this study, we stably expressed 5 different shRNAs targeting *GABARAPL1* in the MDA-MB-436 cell line, which is the only breast cancer cell line, to our knowledge, that has detectable levels of the protein. This protocol allowed us to select cell lines targeting only *GABARAPL1*, without affecting *GABARAP* or *LC3B*, and study the function of this knockdown on the phenotype of breast cancer cells. Our data showed that several shRNAs specific to *GABARAPL1* decreased mRNA expression but only 2 significantly decreased levels of the *GABARAPL1* protein. These stable cell lines exhibited increased cell growth, decreased autophagic flux, and decreased lysosome number. Furthermore, decreased *GABARAPL1* led to increased glutathione (GSH) and ATP, increased basal respiration as well as increased numbers of mitochondria. These observations support the hypothesis that the lower levels of *GABARAPL1* in cancer cells inhibits autophagic flux and thereby the turnover of mitochondria leading to

their accumulation and an increase of basal respiration, levels of ATP and GSH. This increased energetic and antioxidant capacity in response to the suppression of *GABARAPL1* could then contribute to more aggressive phenotypes in cancer cells.

Results

Establishment of *GABARAPL1* knockdown stable cell lines

MDA-MB-436 cells were transfected with 5 different shRNA-*GABARAPL1*-expressing vectors (directed against the open reading frame of the gene) and a shRNA-control-expressing vector, and we selected 5 antibiotic-resistant clones for each shRNA. Cells with stable transfection of shRNA-*GABARAPL1* sh2 exhibited the greatest decrease in the mRNA (80%) (Fig. 1A) and protein expression (96%) levels (Fig. 1B

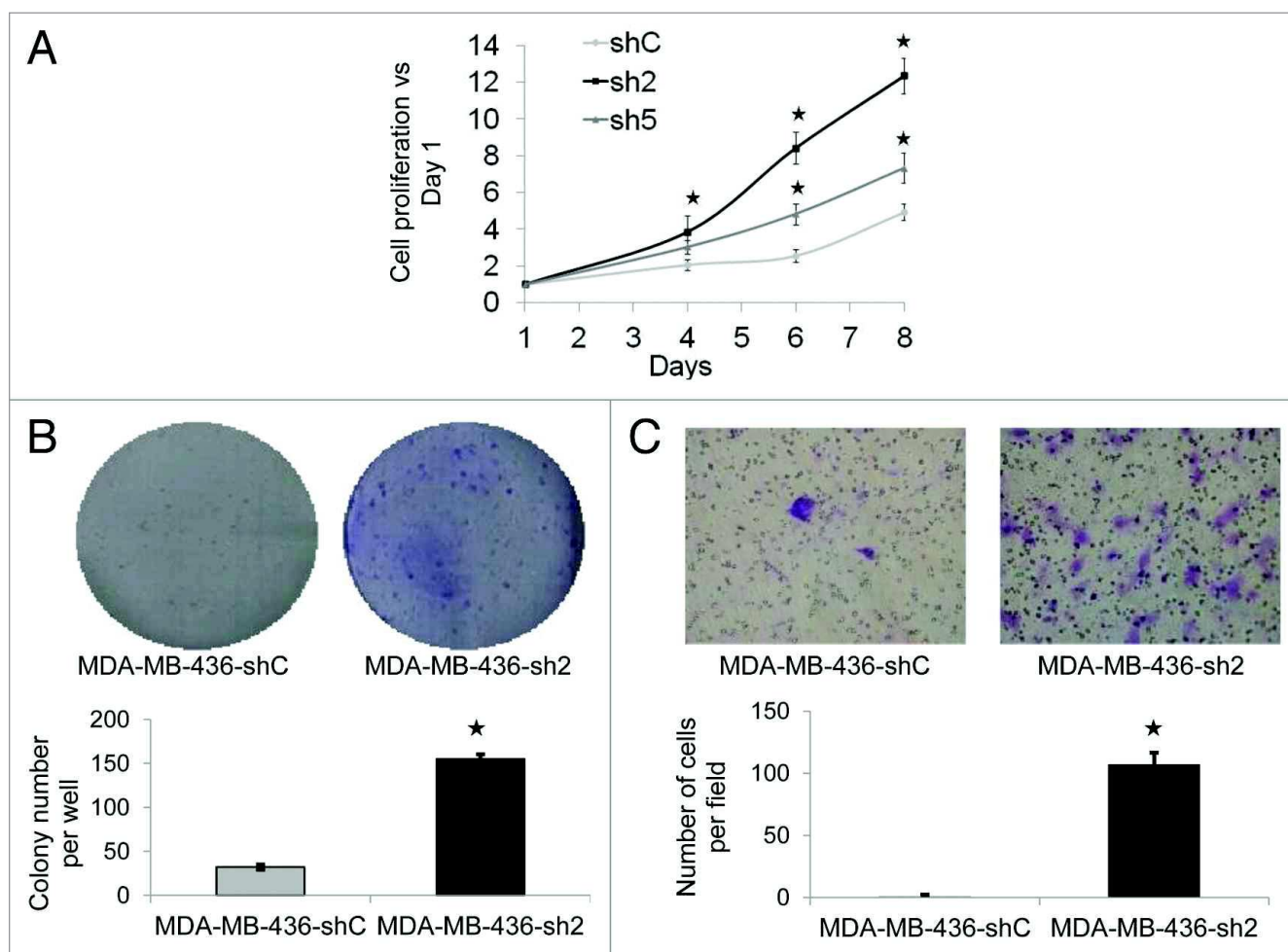


Figure 2. GABARAPL1 knockdown promotes cell growth, colony formation, and invasion. (A) MDA-MB-436-shC, sh2 and sh5 cell growth was determined using a MTT assay over an 8-d period. All data were normalized to the number of cells at Day 1 for each cell line. * $P < 0.05$, vs shC (n = 24). (B) MDA-MB-436-shC and sh2 cells (3,000 in 6-well plates) were grown for a period of 12 d then fixed and stained with crystal violet. The number of colonies was then determined using the Vision-Capt software (VilberLourmat). A representative experiment of 3 performed is shown. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3). (C) MDA-MB-436-shC and sh2 cells were grown in modified Boyden chambers coated with ECM gel. After a 24 h incubation at 37 °C, cells in the upper chamber were swabbed while cells in the lower chamber were fixed, stained with crystal violet and counted using a light microscope at a high magnification ($\times 400$). A representative experiment of 3 performed is shown. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3).

and C) compared with the control cell line expressing the shRNA control (shC), without changing *GABARAP* and *LC3B* mRNA levels. In a second cell line, cells with stable transfection of shRNA-*GABARAPL1* sh5 exhibited a 50% decrease of *GABARAPL1* mRNA (Fig. 1A) and an 80% decrease in protein levels (Fig. 1B and C).

GABARAPL1 regulates MDA-MB-436 proliferation, colony formation ability, and cell invasion

We investigated whether the decrease of *GABARAPL1* expression in the MDA-MB-436 cell line would alter its tumor cell-linked features such as proliferation, colony formation, and invasion. We first performed an MTT assay over an 8-d period to determine whether *GABARAPL1* regulated cell proliferation. We observed that the sh2 and sh5 cell lines exhibited an increased proliferation rate compared with the shC control cell line (Fig. 2A). We also confirmed that this increase was

not due to a decrease in cell death (data not shown). That the sh5 cell line exhibited a lower increase in proliferation compared with the sh2 cells is consistent with the observation that *GABARAPL1* is decreased by 80% in sh5 compared with 96% in sh2 cells (Fig. 1C). We then assessed the ability of the sh2 cell line to form new colonies. As shown in Figure 2B, after 14 d, we found a significantly higher number of colonies formed with the sh2 cell line compared with the shC cell line. Furthermore, using a modified Boyden chamber, we found that the sh2 cells exhibited a substantially higher capacity for migration (Fig. 2C). We have also tested the ability of the sh5 cells to form new colonies and migrate in a Boyden chamber but did not detect any significant change compared with the control cells (Data not shown). This can be explained by the fact that the decrease of *GABARAPL1* in the sh5 cells is less than that observed in the sh2 cells.

GABARAPL1 knockdown inhibits autophagic flux

We have previously shown that GABARAPL1 associates with autophagosomes.² To investigate whether loss of GABARAPL1 alters autophagic flux, we quantified the levels of LC3-II, the autophagosome-associated form of the protein, in the absence and presence of the lysosomal inhibitor chloroquine, in the 3 cell lines, shC, sh2 and sh5. We found that the basal levels of LC3-II were not significantly changed by suppressing the levels of GABARAPL1 in sh2 but were increased in sh5 cells (Fig. 3A, comparing lanes 1 to 3 and 7 to 9, $P < 0.05$ comparing LC3-II/ACTIN between shC and sh5 cells). We calculated the ratio between the LC3-II levels with and without chloroquine as an index of overall autophagic flux,³⁶ and observed a decrease of this ratio in the sh2 and sh5 cell lines compared with the control cells (Fig. 3B). These data indicate that a loss of GABARAPL1 results in a decrease in autophagic flux. To determine whether this attenuation of autophagic flux was due to an inhibition of autophagy induction or the degradation of autophagosomes, we first examined MTOR activation. We found that MTOR and RPS6KB/p70S6K phosphorylation levels were similar in the shC and sh2 cell lines (Fig. 3C and D). Moreover, both shC and sh2 cells increase autophagic flux in response to rapamycin, a MTOR-dependent inducer, as indicated by an increase of LC3-II levels (Fig. S1A–S1C). Autophagic flux as defined by the ratio LC3-II in response to rapamycin+ CQ/LC3-II in response to rapamycin is similar in shC and sh2 cells (Fig. S1D). However the flux in the presence of rapamycin and in the absence of rapamycin is similar in shC cells, and significantly increased in sh2 cells (Fig. 3B, which is also included in Fig. S1D for direct comparison). In contrast, sh2 cells exhibited a greater increase in LC3-II in response to trehalose, a MTOR-independent autophagy inducer, compared with shC cells, and no further increase in LC3-II when both trehalose and chloroquine were present (Fig. S2A–S2C). Hence, the sh2 cell line exhibited a lower increase of autophagic flux in response to trehalose compared with shC cells (Fig. S2D). These data suggest that GABARAPL1 knockdown does not change MTOR signaling, but changes the autophagic response to rapamycin.

Both rapamycin and trehalose inhibited sh2 cell proliferation (Fig. S3A and S3B). As shown in Figure S1 and Figure

S2, autophagic flux was increased in sh2 cells in response to rapamycin, whereas it was unchanged in response to trehalose. Therefore, the inhibition of proliferation by rapamycin or trehalose cannot be simply attributed to an increase in autophagic flux. Consistent with this interpretation, we found no change in cell proliferation for sh2 cells following transfection of *ATG7* or nontargeting siRNA (Fig. S3C and S3D), despite a significant knockdown of *ATG7*, suggesting that further inhibition of autophagy in sh2 cells does not affect proliferation.

GABARAPL1 knockdown increases SQSTM1 mRNA, SQSTM1 protein, as well as BECN1 protein levels

Since we did not detect any change in MTOR signaling associated with GABARAPL1 knockdown, we examined the levels of other key proteins in the autophagic-lysosome pathway and found an increase of BECN1/Beclin 1 and SQSTM1 protein levels in the sh2 and sh5 cells (Fig. 4A and B). Since the transcription of genes encoding these proteins may change according to the stress status of the cells,³⁷ we performed quantitative real-time

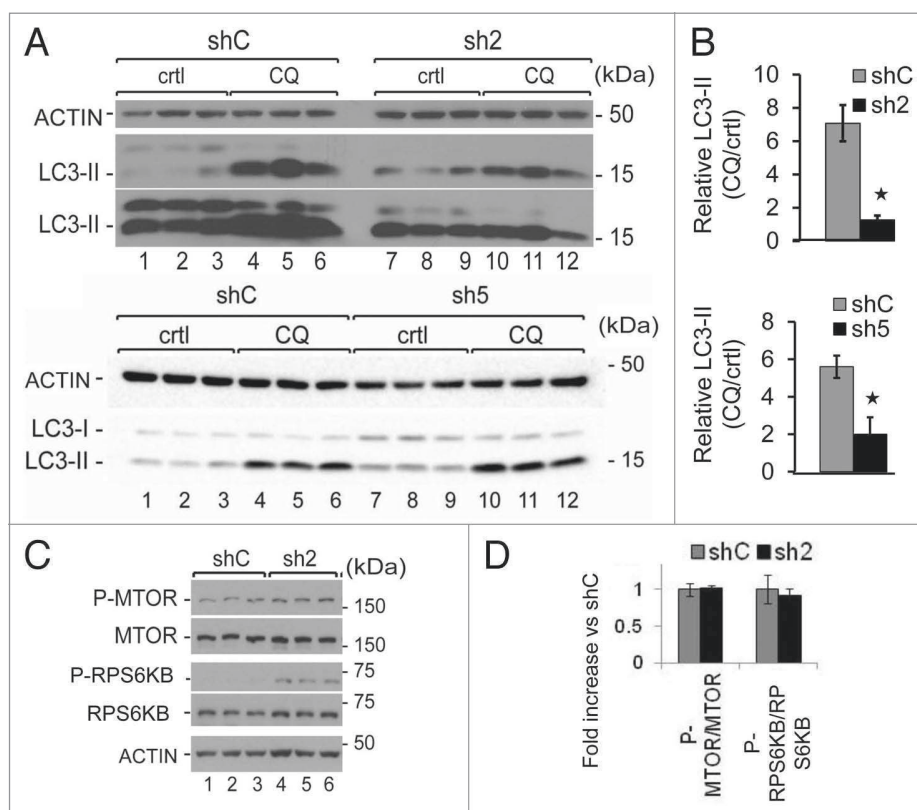


Figure 3. GABARAPL1 knockdown inhibits autophagic flux without changing MTOR signaling. (A) MDA-MB436-shC, sh2, and sh5 cells were cultured for 5 h in the presence (lanes 4 to 6 and 10 to 12) or absence (lanes 1 to 3 and 7 to 9) of the lysosome inhibitor chloroquine (40 μ M). Total proteins (25 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-LC3 and anti-Actin antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. (B) The autophagy flux was determined as the levels of LC3-II in the presence of chloroquine divided by the levels of LC3-II in absence of chloroquine. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3). (C) MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 24 h at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO_2 then total proteins (25 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-phospho-MTOR, anti-MTOR, anti-phospho-RPS6KB, anti-RPS6KB, and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3). (D) Quantification of the signals observed on the western blot in (C) (n = 3).

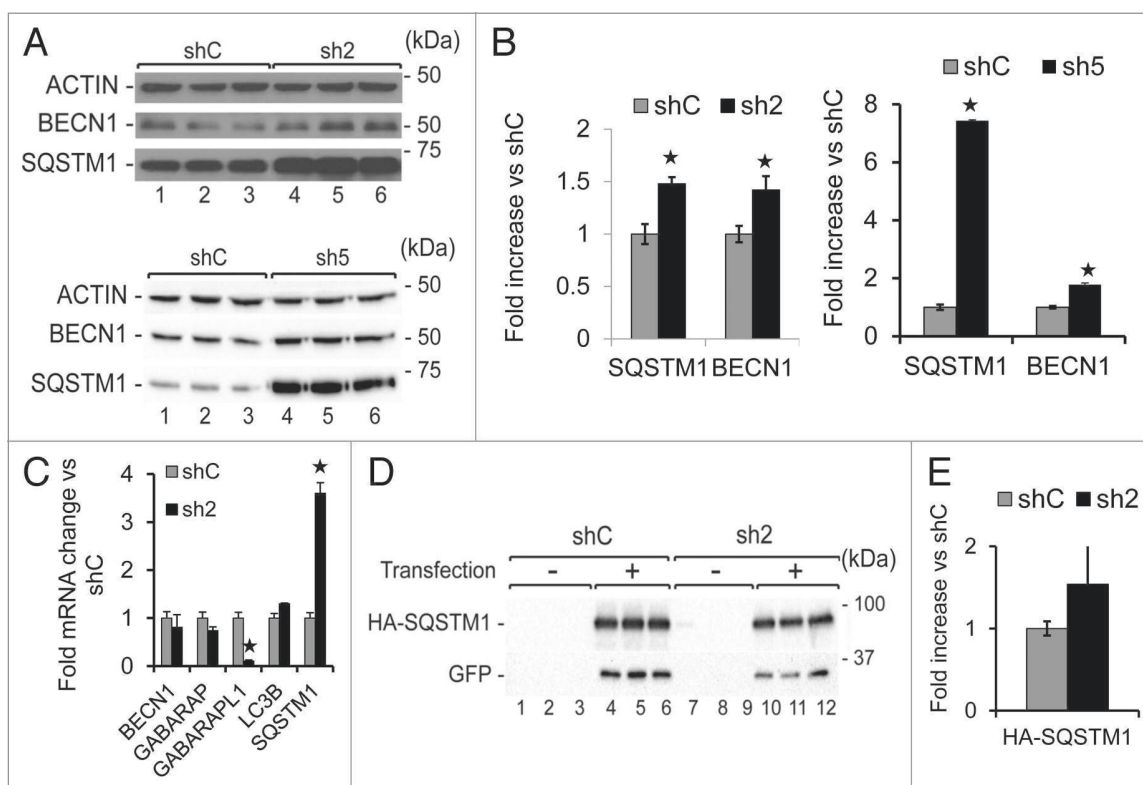


Figure 4. GABARAPL1 knockdown leads to increased SQSTM1 and BECN1 proteins. (A) MDA-MB436-shC, sh2, and sh5 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ then total proteins (25 µg) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-BECN1, anti-SQSTM1 and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. (B) Quantification of the signals observed on the western blot in (A). **P* < 0.05, vs shC (n = 3). (C) *GABARAPL1*, *GABARAP*, *LC3B*, *BECN1*, and *SQSTM1* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in the MDA-MB436-shC and sh2 cells. **P* < 0.05, vs shC (n = 3). (D) MDA-MB436-shC and sh2 cells were cotransfected with the vectors expressing HA-SQSTM1 and pEGFP-N1 (ratio 10:1). Forty-eight h after transfection, total proteins (25 µg) were separated on 12% SDS-PAGE gels, followed by immunoblotting with anti-HA, anti-GFP and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. (E) Quantification of the signals observed on the western blot in (D). **P* < 0.05, vs shC (n = 3).

RT-PCR, and found a significant increase in *SQSTM1* (about 4-fold) but not *BECN1* mRNA levels (Fig. 4C). Therefore, increased transcription of *SQSTM1* in response to the loss of *GABARAPL1* may have contributed to the changes in its protein levels. Nevertheless, the loss of *GABARAPL1* also attenuated autophagic flux. To determine whether *SQSTM1* protein also accumulates in sh2 cells independent of transcription, we transfected shC and sh2 cells with a pCMV-HA-SQSTM1 construct, in which *SQSTM1* expression is under the control of a constitutive CMV promoter. Our data showed a 50% increase in HA-SQSTM1 levels in the sh2 cells compared with the shC cells (Fig. 4D and E). These results suggest that both an increase of transcription and a decrease of autophagic flux contribute to the higher levels of *SQSTM1* in sh2 cells.

GABARAPL1 knockdown decreases *LAMP1* mRNA and protein levels

Next we examined lysosome protein levels in shC, sh2, and sh5 cells. We found a significant decrease of *LAMP1* (by 50%) in sh2 cells but not sh5 cells (Fig. 5A and B). The decreased *LAMP1* protein in sh2 cells may be due to decreased transcription as *LAMP1* mRNA levels were also decreased by 30% in sh2 cells (Fig. 5C). Interestingly, both sh2 and sh5 cells exhibited significant

decrease of *LAMP1* immunostaining compared with shC cells (Fig. 5D). This discrepancy between *LAMP1* western blot analyses and *LAMP1* immunostaining may be due to a difference in protein denaturation procedure in western blotting and in immunostaining. Intriguingly, a decrease of *LAMP1* protein level is not associated with a decrease of lysosomal protease activities. We found that lysosomal CTSB (cathepsin B) activity and protein levels are unchanged, whereas CTSD (cathepsin D) activity and protein levels are increased, in sh2 cells compared with shC cells (Fig. S4A–S4C). This increase of CTSD may be a compensatory response to a decrease of *LAMP1*, as prior studies report that a decrease in lysosome number leads to the induction of cathepsin activities.^{38,39}

GABARAPL1 knockdown increases mitochondrial membrane potential and the demand for mitochondrial bioenergetics

To determine the effects of *GABARAPL1* on mitochondrial membrane potential we used TMRM staining and found a significant increase in the sh2 cells compared with shC cells, and that it decreased to the same levels by FCCP as expected (Fig. 6A). In addition, MitoTracker Red staining (Fig. 6B) was also increased in the sh2 cell line, consistent with either an increase in mitochondrial membrane potential or mitochondrial

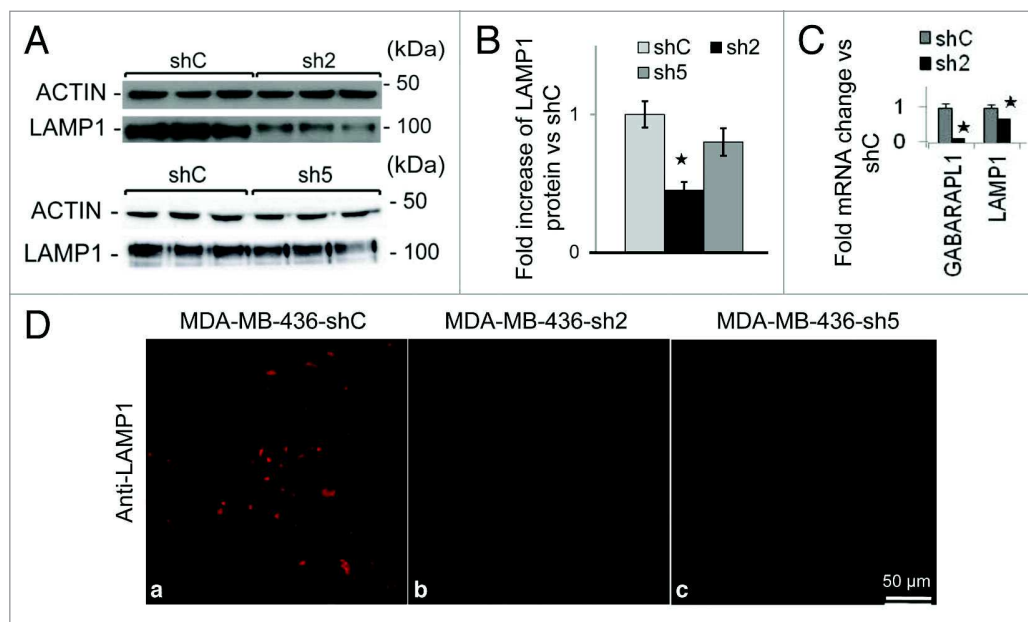


Figure 5. GABARAPL1 knockdown leads to decreased LAMP1 protein levels and immunocytochemistry staining. (A) MDA-MB436-shC, sh2, and sh5 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ then total proteins (25 µg) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-LAMP1 antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. (B) Quantification of the signals observed on the western blot in (A). **P* < 0.05, vs shC (n = 3). (C) *GABARAPL1* and *LAMP1* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in the MDA-MB436-shC and sh2 cells. **P* < 0.05, vs shC. (D) MDA-MB436-shC, sh2 and sh5 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, fixed, permeabilized, blocked with 5% BSA, incubated with a monoclonal anti-mouse LAMP1 overnight at 4 °C and then with an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse for 1 h. The cells were then analyzed using a confocal microscope. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random.

number. Similarly, MitoTracker Red intensity is higher in both sh2 and sh5 cells compared with shC cells as assessed by confocal microscopy (Fig. 6C and D).

We then used the Seahorse XF24 analyzer to determine whether GABARAPL1 knockdown changed mitochondrial function.^{24,40} shC and sh2 cells were plated at similar confluency (Fig. 7A). We then monitored the basal levels of oxygen consumption rate (OCR), and OCR following injection of oligomycin, an inhibitor of ATP synthase, FCCP, an uncoupler, and antimycin A, an inhibitor of mitochondrial complex III (Fig. 7B). We were then able to calculate basal, ATP-linked, proton leak (non-ATP linked), maximal, reserve capacity and nonmitochondrial OCR (Fig. 7C).^{24,40,41} We found an increase in basal OCR in sh2 cells, which was largely due to an increase in non-ATP linked proton leak respiration, consistent with a higher membrane potential. We also determined the extracellular acidification rate (ECAR), which can be ascribed to glycolysis and other proton-generating processes in the cells, but did not detect differences between the 2 cell lines (Fig. 7D). Furthermore, we did not observe any changes of maximal OCR or reserve capacity (Fig. 7C), nor the state apparent (Fig. 7E), in response to GABARAPL1 knockdown, however, the RCR basal and maximal were decreased in sh2 cells compared with shC cells (Fig. 7E). Interestingly, we found that GABARAPL1-suppressed cells had higher amounts of ATP compared with the control cells, which suggests that the mitochondrial population in these cells is capable of meeting the increased demands for proliferation through increased metabolic activity (Fig. 7F).

GABARAPL1 knockdown leads to an increase of mitochondrial protein levels and an increase of damaged mitochondrial DNA

An altered autophagy-lysosome pathway may result in an increased mitochondrial number in GABARAPL1 knockdown cells. Therefore, we then examined whether the levels of proteins involved in mitochondrial biogenesis or homeostasis would be altered in sh2 cells. We found that levels of both PPARGC1A, which is involved in mitochondria biogenesis,⁴² and VDAC1, which is involved in the flux of metabolites to and from the mitochondria,⁴³ were upregulated in sh2 cells compared with shC cells (Fig. 8A and B). Levels of MFN1 (mitofusin 1), which is involved in mitochondria fusion,⁴⁴ DNMI1/Drp1 (dynamitin 1-like), which is involved in mitochondria fission,⁴⁵ PINK1 and PARK2/PARKIN, which are involved in mitophagy,⁴⁶ were unchanged. Our data support the hypothesis that GABARAPL1 is important in maintaining mitochondrial homeostasis by promoting autophagic flux, independent of mitochondrial fission/fusion or selective mitophagy.

As an additional index of mitochondrial number we measured mtDNA copy number relative to the genomic DNA. As shown in Figure 8C, we found increased levels of mtDNA in sh2 cells compared with shC cells. These data also suggest that both an attenuation of autophagic flux and an increase in mitochondrial biogenesis via PPARGC1A increase⁴² may contribute to an increased MitoTracker staining, mtDNA copy number, mitochondrial membrane potential, and VDAC1 protein levels. To further assess mitochondrial health, we measured mtDNA

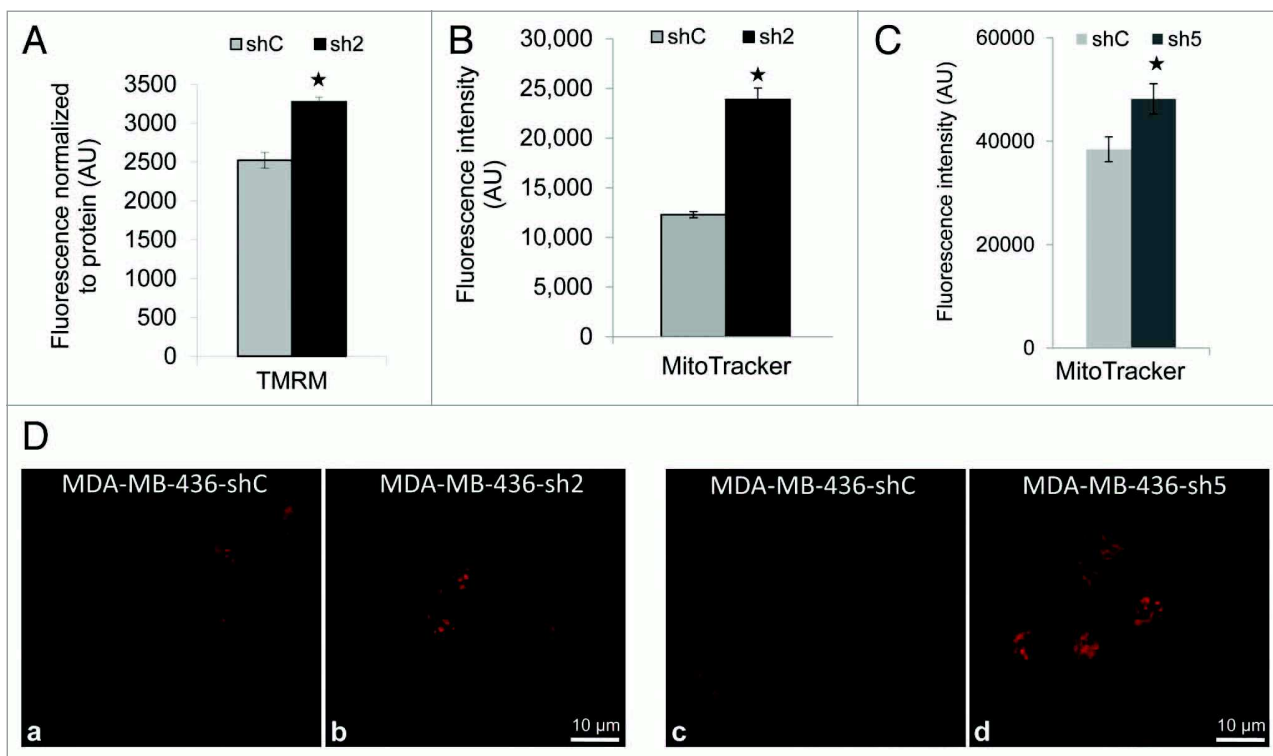


Figure 6. GABARAPL1 knockdown increases TMRM and MitoTracker Red staining. (A) TMRM staining (AU, arbitrary units) normalized to total protein. MDA-MB436-shC and sh2 cells (40,000) were cultured in 96-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were then incubated with 100 nM TMRM for 45 min before being washed with PBS. TMRM fluorescence was measured at 590 nm using a Victor³V Perkinelmer Wallace 1420 Multilabel Counter. FCCP as a control decreased mitochondrial membrane potential to ~750 in both shC and sh2 cells. **P* < 0.05, vs shC (n = 3). **P* < 0.05, vs without FCCP (n = 3). (B) MitoTracker Red fluorescence values (AU) for the 2 cell lines shC and sh2. Cells (600,000) were cultured in 6-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, stained with 50 nM MitoTracker Red for 45 min at 37 °C, trypsinized, washed with PBS and resuspended in 500 μl PBS. Intracellular fluorescence was then assessed using the LSR-II Becton Dickinson flow cytometer. **P* < 0.05, vs shC (n = 3). (C) MDA-MB436-shC and sh5 cells (100,000) were cultured in Labtek 4-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, stained with 50 nM MitoTracker Red for 45 min at 37 °C and washed with PBS. Mitochondria were imaged using the Zeiss LSM 710 confocal microscope and the Zen 2008 software. MitoTracker intensity was quantified by Image J for 25 cells for each cell line in 5 different fields of view chosen at random. **P* < 0.05, vs shC. (D) MDA-MB436-shC and sh2 cells (100,000) were cultured in Labtek 4-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, stained with 50 nM MitoTracker Red for 45 min at 37 °C and washed with PBS. Similarly, MDA-MB436-shC and sh5 cells (100,000) were cultured, stained with MitoTracker Red, and imaged. The pictures were taken with the Zeiss LSM 710 confocal microscope.

damage, and found that sh2 cells exhibited significantly higher mtDNA damage compared with shC cells (Fig. 8D). mtDNA copy number is increased in sh5 cells compared with shC but mtDNA damage in sh5 is comparable to shC, this may reflect an incomplete GABARAPL1 knockdown in sh5 cells (data not shown).

The accumulation of mitochondria and the changes of mitochondrial quality suggest a defect in mitochondrial clearance in sh2 cells. To quantify mitochondrial clearance, we have performed costaining of mitochondria and lysosomes in the presence or absence of FCCP (Fig. S5). We found a slight increase of MitoTracker Red and LysoTracker Green colocalization in sh2 cells compared with shC cells; this may be due to an increase of mitochondrial number, and is not consistent with an attenuated selective mitophagy. We did not find a significant difference of FCCP-induced colocalization of mitochondria and lysosomes in shC or sh2 cells. Similarly, we did not find colocalization of GFP-PARK2 with mitochondria in shC or sh2 cells (data not shown) but it is conceivable that the potential defects in mitochondrial

clearance in sh2 cells are independent of PARK2 translocation to the mitochondria. The exact mechanism of how accumulation of underperforming mitochondria occurs in sh2 cells remains unclear.

GABARAPL1 knockdown promoted cell survival in response to HNE

We incubated shC and sh2 cells with increasing concentrations of HNE, a product of lipid peroxidation previously described to decrease mitochondrial activity,^{40,41,47} through its modification of proteins including ATP5B (ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, β polypeptide)⁴⁸ or SIRT3.⁴⁹ As shown in Figure 9A, after 16 h, the viability of sh2 cells was higher than shC cells after incubation with different concentrations of HNE, indicating that GABARAPL1 knockdown enhances cell survival in response to HNE.

To determine effects of HNE on autophagic flux in sh2 cells, we assessed the LC3-II levels (Fig. 9B and C). We found that LC3-II levels were significantly increased in the shC cells (-1.4-fold) but unchanged in sh2 cells following HNE exposure.

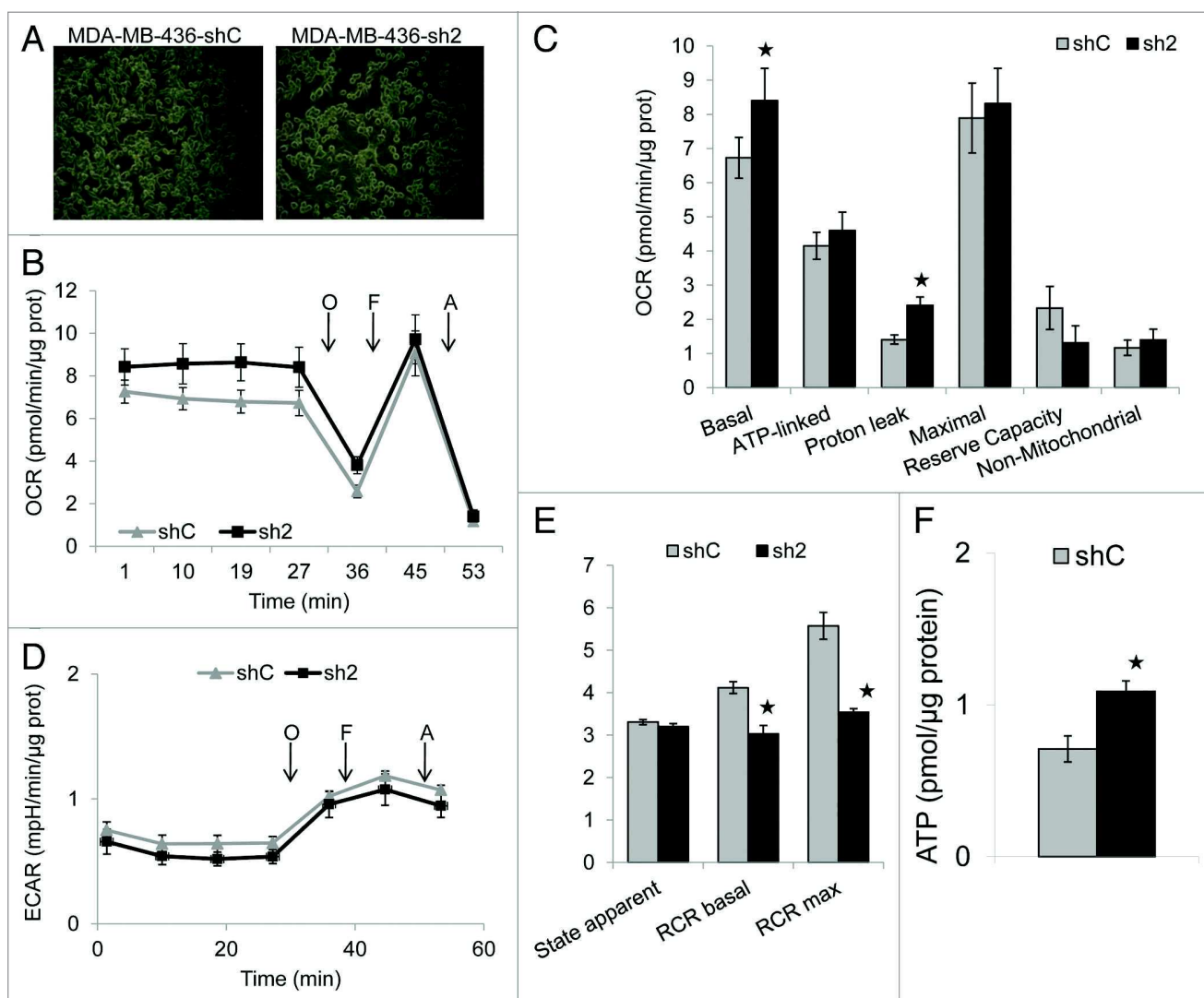


Figure 7. GABARAP1 knockdown increases basal and proton-leak Oxygen Consumption Rate (OCR), increases intracellular ATP levels, and decreases basal and maximal Respiratory Control Ratio (RCR). MDA-MB436-shC and sh2 cells (60,000) were cultured for 24 h in 24-well XF24 Seahorse Biosciences V7 microplates and then bioenergetic function was assessed using the Seahorse XF24 analyzer. Both OCR and ECAR were measured. The ATP synthase inhibitor oligomycin (O; 1 μM), uncoupler FCCP (F; 0.75 μM), and complex III inhibitor antimycin A (A; 10 μM) were injected at the indicated times to determine different parameters of mitochondrial function. (A) Pictures showing similar confluency of the shC and sh2 cells before the start of the Seahorse analysis. (B) OCR values shown as pmol O₂/min/μg protein. (C) Histogram showing the comparison of basal, ATP-linked, proton leak-linked, maximal, and non-mitochondrial OCR of shC and sh2 cells. Nonmitochondrial OCR was determined as the OCR after antimycin A treatment. Basal OCR was determined as OCR before oligomycin minus OCR after antimycin A. ATP-linked OCR was determined as OCR before oligomycin minus OCR after oligomycin. Proton leak was determined as basal OCR minus ATP-linked OCR. Maximal OCR was determined as the OCR after FCCP minus nonmitochondrial OCR. Reserve capacity was defined as the difference between maximal OCR after FCCP minus basal OCR. *P < 0.05, vs shC (n = 4). (D) Extracellular acidification rate (ECAR) values were plotted as mpH/min/μg protein for shC and sh2 cells (n = 4). (E) Histogram showing the comparison of state apparent, RCR basal and RCR maximal of shC and sh2 cells. State apparent was determined as the value corresponding to the following formula: $4 - [(Basal - Oligo)/(Basal - FCCP)]$. RCR basal was determined as the value corresponding to the following formula: $(Basal - AntiA)/(Oligo - AntiA)$. RCR maximal was determined as the value corresponding to the following formula: $(FCCP - AntiA)/(Oligo - AntiA)$. *P < 0.05, vs shC (n = 4). (F) Histogram showing intracellular ATP values (pmoles/μg protein) for shC and sh2 cells. MDA-MB436-shC and sh2 cells (40,000) were cultured in 96-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The intracellular ATP concentration was then determined using the ATPlite kit from PerkinElmer according to the manufacturer's instructions. Luminescence was measured using a Victor²V PerkinElmer Wallace 1420 Multilabel Counter. *P < 0.05, vs shC (n = 3).

Consequently, the ratio of LC3-II with HNE vs. LC3-II without HNE was also lower in the sh2 cells. Basal HNE-protein adducts were higher in sh2 cells compared with shC cells (Fig. 9D and E) (compare lanes 1 to 3 and 4 to 6). After exposure to exogenous HNE, HNE-protein adduct levels increased to 1.5-fold in

the shC cells but did not change in the sh2 cells (Fig. 9D and E). Next we determined the levels of GSH in the 2 cell lines, since the formation of HNE-protein adducts could be attenuated by intracellular cellular glutathione (GSH) which can detoxify HNE through the action of glutathione transferases.⁵⁰ As shown

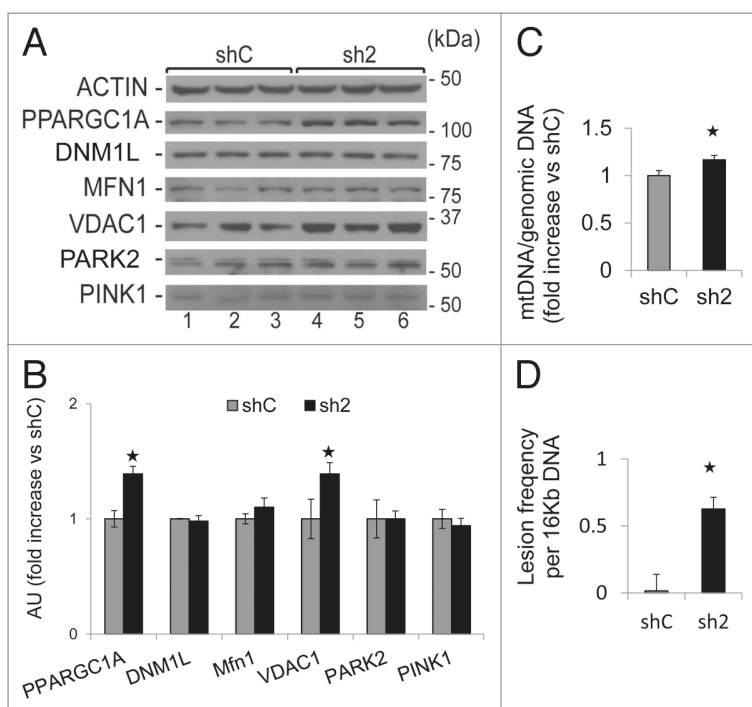


Figure 8. GABARAPL1 knockdown increases mitochondria number, and mtDNA damage. **(A)** MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were then lysed in the presence of protease and phosphatase inhibitors and total proteins (25 µg) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-PPARGC1A, anti-DNM1L, anti-MFN1, anti-VDAC1, anti-PARK2, anti-PINK1, and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. **(B)** Quantification of the signals on the western blot in **(A)**. **P* < 0.05, vs shC (n = 3). **(C)** MDA-MB436-shC and sh2 cells (600,000) were cultured in 6-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were washed with PBS and kept frozen at -80 °C until purification of total DNA. Specific genomic and mitochondrial DNA sequences were amplified by quantitative real-time PCR. The data are presented as the ratio of mitochondrial vs. genomic DNA and normalized to the control cell line, shC. **P* < 0.05, vs shC (n = 3). **(D)** MDA-MB436-shC and sh2 cells (600,000) were cultured in 6-well plates for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were washed with PBS and kept frozen at -80 °C until purification of total DNA. Specific long and short mitochondrial DNA sequences were amplified by PCR. The data were calculated from the levels of long mitochondrial PCR product vs. levels of short mitochondrial PCR product as described in Materials and Methods, and normalized to shC. **P* < 0.05, vs shC (n = 3). Change labels to DNM1L, PARK2.

in **Figure 9F**, GSH levels were significantly higher in the sh2 cell lines, suggesting that the decreased HNE-induced cell death in sh2 cells may be partially provided by the higher levels of GSH.

Discussion

Recent studies have shown that GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles² and the *GABARAPL1* gene may be a tumor-suppressor gene and a prognostic biomarker in breast cancer.¹³ GABARAP, the closest homolog of GABARAPL1, is expressed at low levels in invasive ductal and invasive lobular carcinomas compared with normal breast tissue, and the over-expression of GABARAP in CAL51 decreases their proliferation rate as well as their ability to form colonies in soft-agar and to

form tumors in nude mice.⁵¹ GABARAPL1 overexpression has been shown to inhibit proliferation of the breast cancer cell line (MCF-7),¹³ and their ability to form tumors in nude mice.³⁴ Building on these data, we hypothesized that endogenous GABARAPL1 plays a role in suppressing the cancer cell phenotype and in mediating autophagy. In this study, we established stable cell lines that exhibited significant loss of *GABARAPL1* mRNA and protein levels (**Fig. 1**), and found that these cells exhibited an increased proliferation rate, colony formation and invasion (**Fig. 2**) consistent with the hypothesis that *GABARAPL1* is a tumor suppressor gene.

Autophagy plays a complex role in tumor initiation and progression. On the one hand, autophagy protects against the production of reactive oxygen species in the cells and their deleterious effects in mutating DNA and promoting cell transformation.³⁵ On the other hand, autophagy is required for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by the Ras oncogene and this effect is linked to its role in nutrient recycling such as glucose uptake and increased glycolytic flux.⁵² During the later stages of in vivo tumor formation, autophagy has been shown to be necessary for the cancer cell survival in hypoxia before the vascularization of the tumor.³⁵ Autophagy has also been shown to protect against cellular stress induced by the chemotherapeutic drugs used in cancer treatment leading to several clinical trials involving the use of an inhibitor of the autophagy flux as a combination therapy.⁵³ Even though the mechanism is still unclear, many studies suggest a role of autophagy in the regulation of cancer cell metabolism allowing them to meet the requirements for rapid proliferation. Using multiple autophagic flux analyses, including comparing LC3-II levels with and without chloroquine, endogenous *SQSTM1* mRNA and protein levels, as well as exogenous constitutively expressed pCMV-HA-SQSTM1 (**Fig. 3A and B**; **Fig. 4D and E**), we have found that GABARAPL1 knockdown cells exhibit a decreased autophagic flux. Interestingly, sh5 cells with incomplete GABARAPL1 knockdown also

exhibited decreased autophagic flux, although to a less extent than sh2 cells and did not result in the same colony formation and migration phenotypes as the sh2 cells.

The underlying mechanism of attenuated autophagic flux as a result of GABARAPL1 knockdown appears to be a significant decrease of LAMP1 protein levels and lysosome number (**Fig. 5A–D**), supporting the hypothesis that loss of GABARAPL1 leads to an attenuation of autophagosomal degradation. Importantly, we did not find a difference in the phosphorylation of MTOR and RPS6KB between control and GABARAPL1 knockdown cells, suggesting an MTOR-independent attenuation of autophagic flux (**Fig. 3C and D**). Furthermore, we found increased BECN1 levels that cannot explain an attenuation of autophagic flux (**Fig. 4A–C**). Previous studies have shown that autophagy and lysosomal genes are coordinately regulated by

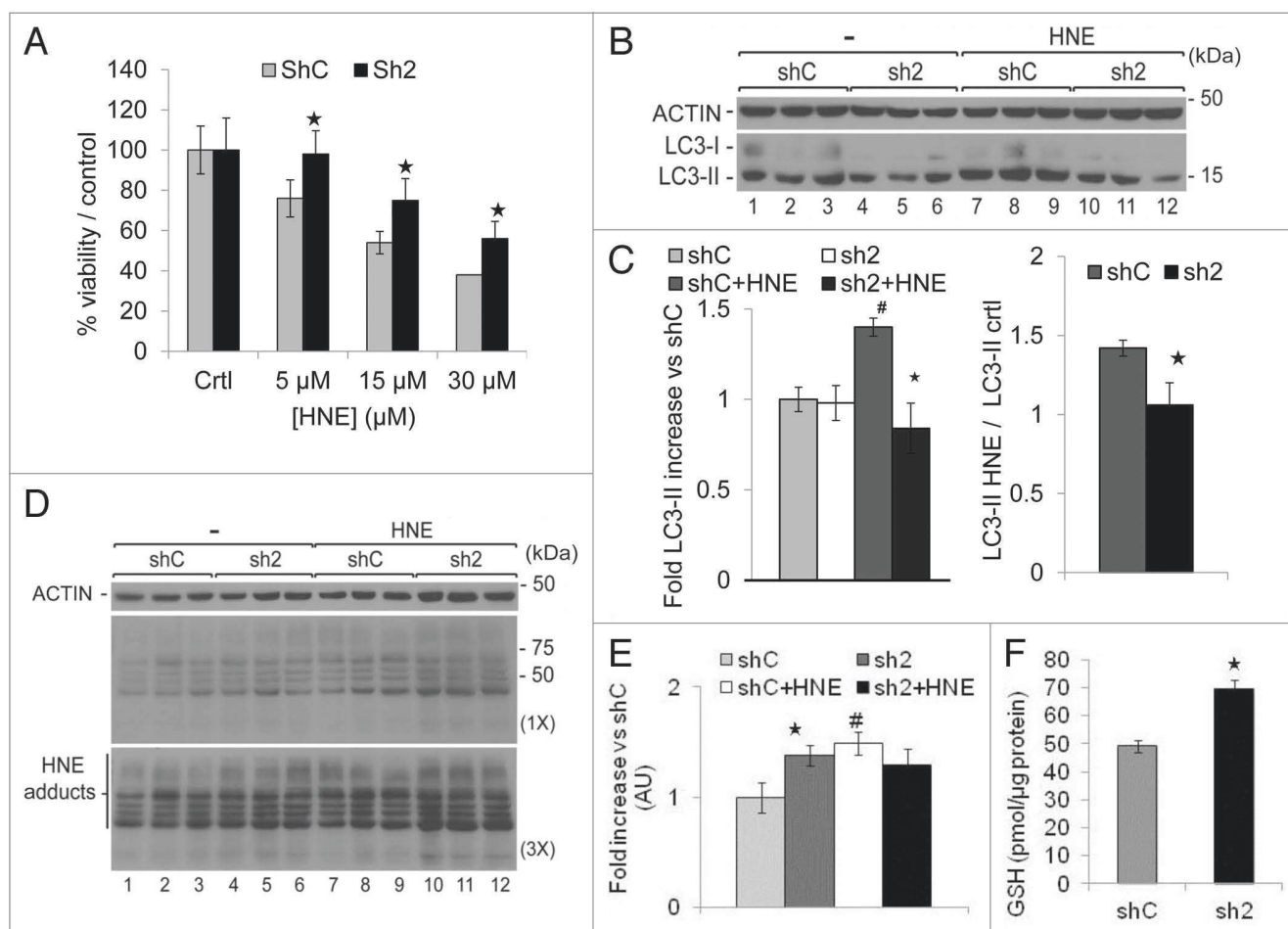


Figure 9. GABARAPL1 knockdown enhances cell survival in response to HNE, inhibits autophagic flux in response to HNE, and increases intracellular HNE-protein adducts and glutathione (GSH) concentration. **(A)** MDA-MB436-shC and sh2 cells were grown for 16 h in the presence of HNE (0, 5, 15 or 30 µM). Cells were then trypsinized and counted in the presence of trypan blue. The values were normalized to the number of cells determined in the control samples for each cell line. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3). **(B)** MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 16 h in the presence of HNE (30 µM). Cells were then lysed and total proteins (25 µg) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-LC3 and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of 3 performed is shown. **(C)** Quantification of the LC3-II signals observed in the western blots shown in **(B)**. HNE-induced changes of LC3-II levels were determined as the levels of LC3-II in response to HNE divided by the levels of LC3-II without HNE. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3), # $P < 0.05$, vs untreated cells (n = 3). **(D)** MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 16 h in the presence of HNE (30 µM). Cells were then lysed in HNE lysis buffer containing 10 mM N-ethylmaleimide and total proteins (25 µg) were separated on 12% SDS-PAGE gels followed by immunoblotting with anti-4-HNE and anti-ACTIN antibodies and the ECL Plus reagent. **(E)** Quantification of the signals observed in the western blot in **(D)**. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3), # $P < 0.05$, vs untreated cells (n = 3). **(F)** Total cellular GSH was determined using the GSH recycling assay, as described in Materials and Methods, using a Beckman Coulter DU-800 spectrophotometer, after shC and sh2 cells (600,000) were cultured in 6-well plates for 24 h at 37 °C. * $P < 0.05$, vs shC (n = 3).

master transcription activators and repressors,⁵⁴⁻⁵⁶ such coordinate regulation appears to be perturbed in GABARAPL1 knockdown cells. In this context, it has been previously shown that rapamycin and trehalose are able to induce TFEB (transcription factor EB), a transcription factor specifically inducing the transcription of genes involved in the autophagosomal and lysosomal biogenesis including LAMP1.^{54,55} We found that rapamycin and trehalose inhibited cell proliferation and abolished the effects of GABARAPL1 suppression on cell proliferation. The effects of rapamycin and trehalose on cell proliferation may be linked to an increase in LAMP1. Furthermore, although the exact mechanisms are unclear, our observation that LAMP1 is decreased and

CTSD is increased in sh2 cells is consistent with prior findings and supports a differential role of lysosomal components in cell proliferation.⁵⁷⁻⁵⁹

GABARAP1 has been previously linked to the selective autophagy of mitochondria, shown to interact with BNIP3L, a mitochondrial protein, and to be recruited to mitochondria to induce their clearance during the maturation of reticulocytes.³¹ Because mitophagy degrades damaged mitochondria and therefore suppresses reactive oxygen species formation and DNA damage, and that our results showed that autophagic flux is attenuated in the absence of GABARAP1, we determined whether GABARAP1 knockdown would lead to desensitization to mitochondrial

stressor-induced autophagy. Indeed, we found that in response to HNE, which is a byproduct of lipid peroxidation previously shown to modify mitochondrial proteins and inhibit their activity,^{24,41,48} GABARAPL1 knockdown cells exhibit less of an increase in LC3-II levels compared with control shC cells (Fig. 9B and C). However, cell survival in response to HNE is dependent on GABARAPL1 (Fig. 9A). Further, GABARAPL1 knockdown induced a higher level of total endogenous HNE-protein adducts in the cells, and there were no further increases after additional HNE exposure in these cells (Fig. 9D). Additionally, glutathione steady-state levels are increased in the GABARAPL1 knockdown cells compared with control cells (Fig. 9G), and the higher level of glutathione may form conjugates with the exogenously added HNE to inhibit its toxic effect in the cells.⁶⁰ The increase of endogenous HNE-protein adducts may be due to the attenuation of autophagic flux, and the increased adducts may also signal to induce an antioxidant response for the cells to produce more enzymes involved in glutathione synthesis.⁶¹

We also determined the impact of GABARAPL1 knockdown on mitochondrial function. We found that GABARAPL1 knockdown cells exhibited increased mitochondrial membrane potential, mitochondrial biogenesis factor PPARGC1A, mitochondrial protein VDAC1, both total and damaged mtDNA (Figs. 6–8). In addition to exhibiting decreased autophagic flux as discussed above (Fig. 4), sh5 cells with incomplete GABARAPL1 knockdown also exhibited increased total mtDNA but not damaged mtDNA (Fig. 8), suggesting that autophagic flux and accumulation of mitochondrial mass are sensitive to moderate change of GABARAPL1 levels, whereas increased colony formation, cell migration/invasion, and mtDNA damage occur only when GABARAPL1 level decreases more than 70% (Fig. 1).

These competing impacts on mitochondrial homeostasis due to *GABARAPL1* knockdown resulted in a cellular bioenergetic profile that did not substantially deviate from that of the control shC cells, other than a significant increase in proton leak (Fig. 7). Importantly, ATP levels were increased in response to GABARAPL1 inhibition showing that although a decrease in mitochondrial quality occurred, the overall mitochondrial population was still competent to meet the energetic demands of the cell. This could be due to the activation of mitochondrial biogenesis in attempt to restore the integrity of the mitochondrial population and a small but active population of functioning mitochondria.

Our study supports the model that GABARAPL1 inhibition induces a depletion of LAMP1 and lysosomal number, attenuates autophagic flux, and leads to an accumulation of damaged mitochondria, associated with stimulated mitochondrial biogenesis leading to increased mitochondrial number, mitochondrial protein, mitochondrial membrane potential, mitochondrial respiration, and ATP levels (Fig. 10). The increase of mitochondrial number and cellular glutathione, which itself could be stimulated by an increase in the basal levels of mitochondrial reactive oxygen species, further resulted in resistance to cell death, and may contribute to increased proliferation and aggressiveness of these cells. Our data demonstrate that GABARAPL1 plays an important role in regulating the autophagy-lysosome pathway, mitochondrial activity, cell metabolism, and proliferation.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen. The following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Proteintech, 11010-1-AP, 1:1,000), polyclonal anti-LC3B (Sigma-Aldrich, L8918, 1:3,000), monoclonal anti-SQSTM1/p62 (Abnova, H00008878-M01, 1:3,000), monoclonal anti-LAMP1 (Developmental hybrid studies, H4a3, 1:1000), monoclonal anti-VDAC1 (Abcam, ab16816, 1:1000), monoclonal anti-DNM1L/Drp1 (Abcam, ab56788, 1:1000), polyclonal anti-MFN1 (Santa Cruz, H65 sc-50330, 1:1000), polyclonal anti-PPARGC1A (Santa Cruz, H300 sc-13067, 1:1000), monoclonal anti-PINK1 (Abcam, ab23707, 1:1000), polyclonal anti-PARK2 (Santa Cruz, H300 sc-30130, 1:1000), goat anti-4-HNE (Alpha diagnostics, HNE12-S, 1:3000), polyclonal rabbit anti-MTOR (Cell Signaling, 2983, 1:1000), polyclonal rabbit anti-phospho-MTOR (Cell Signaling, 2971, 1:1000), polyclonal rabbit anti-RPS6KB (Cell

Signaling, 9202, 1:1000), polyclonal rabbit anti-phospho-RPS6KB (Cell signaling, 9205, 1:1000), polyclonal rabbit anti-CTSB (Santa Cruz, sc-13985, 1:1000), polyclonal goat anti-CTSD (Santa Cruz, sc-6486, 1:1000), and polyclonal anti-ACTIN (Sigma-Aldrich, A5060, 1:10,000). Bafilomycin A₁ (Sigma, B1793) was prepared as a 50 μM stock in DMSO. Rapamycin (Sigma-Aldrich, R8781) was purchased as a 2.74 mM stock in DMSO. Chloroquine (Sigma-Aldrich, C6628) was prepared as a 200 mM stock in water. Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM, Sigma-Aldrich, T5428) was prepared as a 100 mM stock in DMSO. 3-Methyladenine (3-MA, Sigma-Aldrich, M9281) was prepared fresh as a 10 mM working solution in complete culture medium. Oligomycin (O4876), FCCP (C2920) and antimycin A (A8674) were purchased from Sigma-Aldrich. 4-hydroxynonenal (HNE) was prepared fresh from a stock solution purchased from Calbiochem (393204). The HA-SQSTM1-expressing vector was purchased from Addgene (28027, Dr Qing Zhong).

Cell culture and stable cell lines

The MDA-MB-436 cell line (ATCC) was maintained in DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen, 11965-092) containing 1 mM L-glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum (Atlanta Biologicals, S111-50), 100 μg/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen, 15140-122) and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen, 11360-070) in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. Cells were split every 4 d (1:3 dilution). The MDA-MB-436-shRNA-*control* (shC or control) and -*GABARAPL1* (sh2 or GABARAPL1 KD) cell lines were maintained in complete medium supplemented with 1 μg/ml puromycin (Invitrogen, 28-111-QL). To create these stable cell lines, MDA-MB-436 cells (10⁶) plated in 10-cm diameter cultures dishes were transfected the day after plating using 10 μg of 5 different pKo.1-puro-shRNA-*GABARAPL1* vectors (Mission shRNA, Sigma-Aldrich, SHCLNG-NM_031412, shRNA 443s1c1) and 1pKo.1-puro-shRNA-*control* vector (Sigma-Aldrich, SHC002) and 20 μl TransFast reagent (Promega, E2431) according to the manufacturer's protocol. After 48 h

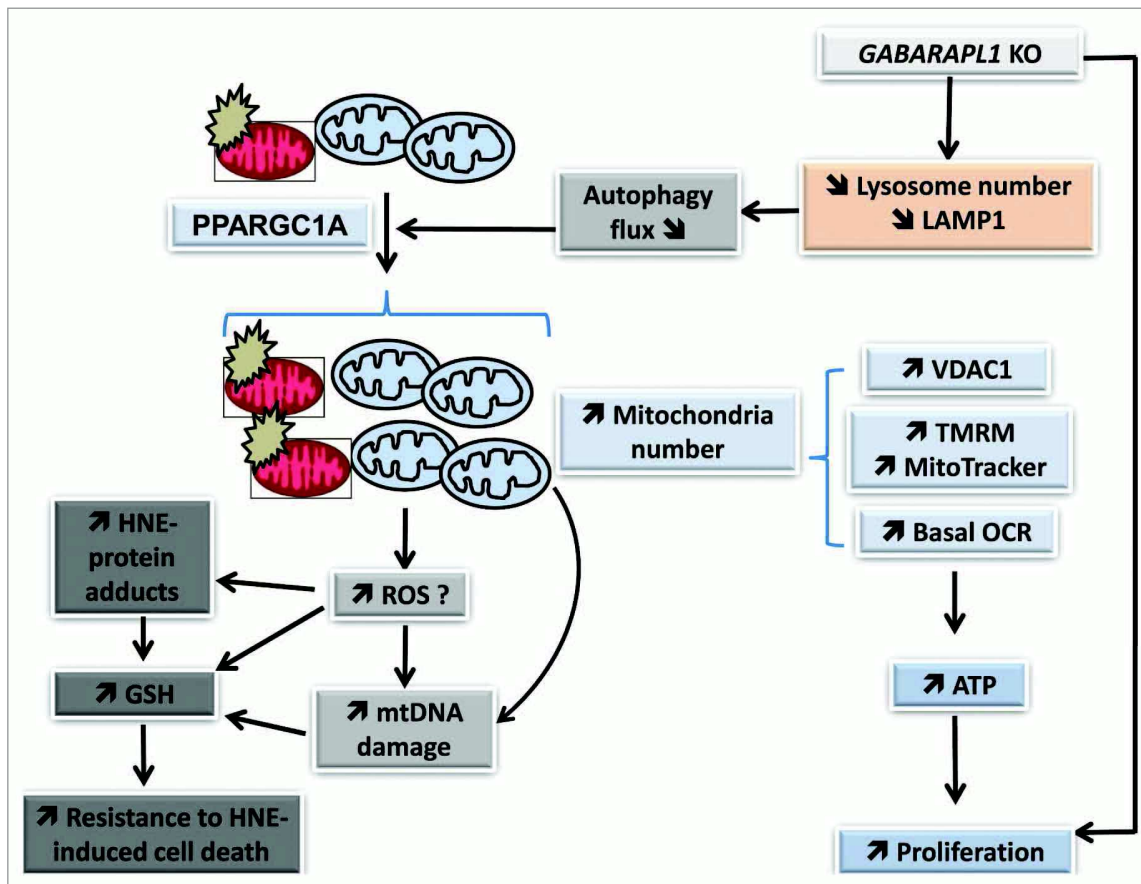


Figure 10. GABARAPL1 function in breast cancer cells. Our studies indicate that GABARAPL1 plays an important role in autophagic flux, mitochondrial homeostasis, metabolic programming, and control of cell proliferation in breast cancer MDA-MB-436 cells. *GABARAPL1* knockdown induces a disruption of the autophagosome-lysosome pathway leading to a decrease of lysosome number and accumulation of damaged mitochondria, increased mitochondrial biogenesis and number, and increased mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential, mitochondrial proteins, and mtDNA damage. This is further evidenced by an increase of HNE-protein adducts, increased antioxidant response, and increased ATP levels. The increase of mitochondrial number, cellular glutathione, and cellular ATP may contribute to resistance to cell death and increased proliferation.

incubation, 3 $\mu\text{g/ml}$ puromycin was added to each plate and the medium was changed every 2 d for the next 14 d until the appearance of antibiotic-resistant single clones. Five resistant clones for each shRNA transfection were then tested for the expression of *GABARAPL1*, *GABARAP* and *LC3B* mRNAs and proteins by qRT-PCR and western-blotting, respectively. The stable cell lines used later on in this study are the MDA-MB-436-shRNA-control clone 2 (shC or control) and the MDA-MB-436-shRNA-*GABARAPL1* clone 2 (sh2 or *GABARAPL1* KD). The sh5 clone has been designed using the same protocol as described for the sh2 clone but using a different shRNA (Mission shRNA, Sigma-Aldrich, SHCLNG-NM_031412, shRNA 570s1c1).

Quantitative real-time RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted using the TRI Reagent (Invitrogen, AM9738). To remove any genomic DNA contamination, total RNAs were treated with RNase-free DNase I (Invitrogen, AM2222) and purified with phenol/chloroform. A volume of 1 μg of total RNAs was reverse transcribed using M-MLV RT (Sigma-Aldrich, M1302) and oligo(dT)15 primers following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was run on the

Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) using the SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4309155) and the following parameters: 10 min at 95 $^{\circ}\text{C}$ followed by 40 cycles: 15 s at 95 $^{\circ}\text{C}$ and 1 min at 60 $^{\circ}\text{C}$. The target genes levels (*GABARAPL1*, *GABARAP*, *LC3B*, *LAMP1*, *SQSTM1*, and *BECN1*) were normalized to the levels of the *H3B2* housekeeping gene (forward: 5'-GCTAGCTGGA TGCTTTTTT G-3' and reverse: 5'-GTGGTAAAGC ACCCAGGAAA-3'). The primer sequences were: *GABARAPL1* (5' CCCTCCCTTG GTTATGATCC A-3' and 5'-AGGAAGGGAT TGCTGGGTTC T-3'), *GABARAP* (5'-ACTCCCACCC CACAAAATCC-3' and 5'-GCCTTTCCCA TCCTGCTGTA-3'), *LC3B* (5'-CGGAAAGCAG CAGTGTACCA-3' and 5'-GGCAGAAGGG AGTGTGTCTG A-3'), *LAMP1* (5'-GTGTCTGCTG GACGAGAACA-3' and 5'-ATGAGGACGA TGAGGACCAG-3'), *SQSTM1* (5'-AAATGGGTCC ACCAGGAAAC TGGA-3' and 5'-TCA ACT TCAA TGCCAGAGG GCTA-3') and *BECN1* (5'-TCACCATCCAGGAACCTCACA-3' and 5'-CCTGGCGAG GAGTTTCAAT A-3'). Each sample was analyzed in triplicate

and then differences in the expression of each gene were quantified using the $\Delta\Delta C_t$ approach using the endogenous control.

Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA lysis buffer [50 mM TRIS-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS supplemented with protease inhibitors (Sigma, P8340)] then 25 or 50 μ g of lysates were resolved on a 12% or 15% polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) at 60 V for 60 min and 120 V for another 60 min. Proteins were transferred onto Immuno-Blot PVDF 0.2 μ m membranes (Bio-Rad, 162-0177) for 90 min at 90 V at 4 °C in transfer buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.037% SDS, 20% methanol). Membranes were subsequently incubated in blocking buffer for 1 h [TBS-T (20 mM TRIS-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% skim milk powder] and incubated with primary antibodies in blocking buffer overnight at 4 °C. The secondary horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit (Sigma-Aldrich, A0545) and anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich, A4416) were prepared in TBS-T. After 1 h incubation, the membrane was washed 3 times in TBS-T and incubated with the Pierce ECL western-blotting substrate (Pierce, 32106) according to the manufacturer's recommendations. All western blots were analyzed using the ChemiDoc XRS+ from Bio-Rad. All western blot signals were quantified before saturation using the Image Lab 2.0 software provided with the ChemiDoc XRS+ according to the manufacturer's instructions.

For the HNE western-blotting, cells were lysed in HNE lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% glycerol, 1% NP40 [Fisher Scientific, NC9375914]) supplemented with protease inhibitors (Sigma-Aldrich, P8340) and 50 mM N-ethylmaleimide (Sigma-Aldrich, E3876). The samples were run the same day to avoid any freeze-thaw step. The goat anti-HNE antibody was purchased from Alpha Diagnostics (HNE-12S) and used at a 1:3000 dilution overnight in TBS-T supplemented with 5% horse serum (Life Tech Corp, 16050-130).

Cell proliferation assays

For the MTT assay, MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cell lines were plated in 96-well plates (3,000 cells per well, 24 wells per cell line) and MTT assays were conducted every day over a 10-d period using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, M5655) as previously described.¹³

For the trypan blue exclusion assay, MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells were plated in 12-well plates (100,000 cells per well, 3 wells per cell line) and cells were counted every day over a 4 d period. After discarding the culture medium, cells were incubated in 100 μ l Trypsin-EDTA (Invitrogen, 25200-056) for 5 min at 37 °C. After further addition of 200 μ l of complete medium, cells were supplemented with 30 μ l of trypan blue (0.04% final concentration, Cellgro, 25-900-CI) and the viable cells density was then determined using a Malassez hemocytometer.

Colony formation assay

MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells were plated in 6-well plates (3,000 cells per well) and incubated in complete culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum,

100 μ g/mL penicillin/streptomycin and 1 mM L-glutamine at 37 °C and 5% CO₂. After 12 d, the colonies formed were fixed 10 min. with 100% ethanol and stained for 10 min. with crystal violet (0.5% in 2% ethanol). Each well was then washed 3 times with distilled water and colonies were counted using the Vision-Capt software (VilberLourmat).

Cell invasion assay

Cell invasion was evaluated using modified Boyden chambers (6.5-mm diameter and 8- μ m pore size, SPL Life Sciences, 35224). Boyden chambers were coated with 50 μ g ECM gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma-Aldrich, E1270) diluted in DMEM and incubated for 5 h at 37 °C. 100,000 cells in 250 μ l of serum-free DMEM were seeded into the upper chamber and 500 μ l of complete culture medium were added in the lower compartment. After 24 h incubation in a 5% CO₂ incubator at 37 °C, cells on the upper surface were removed using a swab and cells on the lower surface were fixed 5 min with absolute ethanol and stained with crystal violet (0.5% in 2% ethanol) for 10 min. The filters were then washed with distilled water and cells were counted using a light microscope at a high magnification (\times 400).

CTSB and CTSD activity assays

CTSB and CTSD activities were quantified using the CTSB Activity Assay Kit (Abnova, KA0766) and the CTSD activity assay kit (Sigma, CS0800) following manufacturer's instructions. Briefly, cells were collected by scraping and centrifugation (1500 g for 5 min at 4 °C), washed once with PBS (0.17 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) before a second spin and then lysed using CTSB cell lysis buffer (kit) or MES lysis buffer for CTSD (20 mM MES, pH 6.8, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 mM NaH₂PO₄) supplemented with phosphatase (Sigma, P0044) and protease (Sigma, P8340) inhibitors. Lysates were then incubated for 30 min on ice, centrifuged at 15000 g for 5 min and supernatants were subjected to DC-Bradford assay (Bio-Rad, 500-0114).

For the CTSB activity assay, 50 μ g of cell lysate were combined with the CTSB reaction buffer (kit) in a 96-well black plate with clear top and bottom. E64 (Sigma, E8640) was used for inhibition of CTSB activity. After addition of a fluorogenic CTSB substrate (kit), the plate was incubated for 2 h at 37 °C before values were read in fluorescence units, which were then normalized to controls.

For the CTSD activity assay, 30 μ g of lysate per sample were used for activity readings with and without pepstatin A (PepA, 2 mg/ml, Sigma, P5318) in a black 96-well plate with clear top and bottom. PepA values were subtracted from non-PepA values to determine CTSD activity in fluorescence units, which were then normalized to control samples.

Mitochondrial bioenergetic measurements using the Seahorse XF-24 analyzer

To measure mitochondrial function in MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells, an XF24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) was used. To allow comparison between experiments, data are expressed as the oxygen consumption rate in pmol/min or the extracellular acidification rate in mpH/min, normalized to cell protein contents

determined by the DC-Bradford (Bio-Rad, 500-0114) method. The optimal seeding density of the cells needed to obtain measurable OCR and ECAR was established, and both ECAR and OCR show a proportional response with cell number (data not shown). For our experiments, a seeding density of 60,000 cells per well was selected to allow both increase and inhibition of OCR and ECAR. In our experiments, oligomycin, FCCP, and antimycin A concentrations were 1, 0.75, and 10 μ M, respectively.

ATP assay

MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells were plated in 96-well plates (40,000 per well) and incubated for 24 h at 37 °C. The intracellular ATP concentration was then assessed using the ATPlite kit from PerkinElmer (6016943) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, culture medium was discarded and cells were incubated first for 5 min in the kit lysis buffer, then for further 5 min with the substrate solution, before being adapted to the dark for 10 min. Emitted luminescence was then measured using a Victor²V 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer Wallac, Waltham, MA, USA). The intracellular ATP amounts (in pmol) were calculated according to an ATP standard curve and normalized to the quantity of protein in each sample using a DC-Bradford assay (Bio-Rad, 500-0114).

GSH recycling assay

The quantification of GSH in our 2 cell lines was performed according to the protocol previously described.⁶² Briefly, MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells were plated in 6-well plates (600,000 per well) and incubated for 24 h at 37 °C. Culture medium was discarded and cells were washed twice in GSH wash buffer (10 μ M DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid, in 1 X PBS, Sigma-Aldrich, D6518) before lysis in GSH wash buffer supplemented with 0.1% Triton X-100 for 10 min on ice. Collected cells were centrifuged at 12,000 g for 15 min and supernatants were collected for GSH quantification. The reaction sample was composed of 10 μ l sample, 60 μ l DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 10 mM, Sigma-Aldrich, D8130], 900 μ l GSH wash buffer, 20 μ l NAD(P)H (10 mM, Sigma-Aldrich, N1630) and 10 μ l glutathione reductase (Sigma-Aldrich, G9297). The fluorescence was then measured at 412 nm and 37 °C over a 4 min period using a DU-800 spectrophotometer (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) and the rates of the reactions were expressed in dAbs/min. The GSH amounts (in pmol) were determined according to a GSH standard curve and normalized to the quantity of protein in each sample using a DC-Bradford assay (Bio-Rad, 500-0114).

TMRM staining

MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells were plated in 96-well plates (40,000 per well) and incubated for 24 h at 37 °C. Cells were then incubated with TMRM (TetraMethylRhodamine Methyl ester perchlorate, 100 nM) in phenol-free complete medium for 45 min at 37 °C before being washed twice with PBS. TMRM fluorescence was then measured at 590 nm using a Victor³V PerkinElmer Wallac 1420 Multilabel Counter. The TMRM cell incorporation determined as arbitrary units of fluorescence was then normalized to the quantity of protein in each sample using a DC-Bradford assay (Bio-Rad, 500-0114).

mtDNA quantification

DNA was extracted from MDA-MB-436-shC and MDA-MB-436-sh2 cells. Quantitative real-time PCR was performed by using a SYBR Green master mix (Life Tech Corp, 4368708) in an ABI 7500 ((3175 Staley Road, Grand Island, NY 14072, USA). The primer sequences used for mtDNA were mtDNA-F (5'-CACCCAAGAA CAGGGTTTGT-3') and mtDNA-R (5'-TGGCCATGGG TATGTTGTTA A-3'). The primer sequences for the nuclear DNA were 18S-F (5'-TAGAGGGACA AGTGCGCTTC-3') and 18S-R (5'-CGCTGAGCCA GTCAGTGT-3') and targeted the human nuclear 18S DNA. Cycling conditions were as follows: 94 °C for 15 s, followed by 40 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 60 °C for 1 min. The mtDNA copy number was normalized to the amplification of the 18S nuclear amplicon.

mtDNA damage assay

Mitochondrial DNA damage was evaluated by PCR method as described previously.⁶³ Briefly, total DNA was extracted and used as PCR sample. The primer sequences used for mtDNA long segment (16 kb) were mtLongF (5'-TGAGGCCAAA TATCATCTG AGGGGC-3') and mtLongR (5'-TTTCATCATG CGGAGATGTT GGATGG-3'). The primer sequences for mtDNA short (80 bp) segment were mtShortF (5'-ACCCAAGAAC AGGGTTTGT-3') and mtShortR (5'-TGGCCA TGGG TATGTTGTTA A-3'). The mtDNA long and short segments were amplified using AccuPrimeTM Taq DNA Polymerase High Fidelity kit (Life Tech Corp, 12346-086) and separated by agarose gel electrophoresis. The long PCR conditions were as follow: 94 °C for 11 s, followed by 27 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, 67 °C for 12 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The short PCR conditions were as follow: 94 °C for 5 s, followed by 19 cycles at 94 °C for 25 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The gels were stained with ethidium bromide and visualized with AlphaImager (Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA). Densitometry analysis was performed using Image J software. Lesion frequency per 16 kb of mtDNA was calculated using as described previously.^{64,65}

Mitochondria staining

Cells were plated in 4-well Labtek chambers (Nunc, 155-383) at a concentration of 100,000 cells per well and incubated at 37 °C overnight. Cells were stained in fresh complete medium with 50 nM MitoTracker[®] RedCMXRos (Invitrogen, M7512). Living cells were then examined using a fluorescence laser scanning LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) (UAB microscopy core, Birmingham, AL). Images were captured using the Zen 2008 software. All figures were assembled using Adobe Photoshop CS2 and Adobe Illustrator CS software.

LAMP1 immunostaining

Cells cultured for 24 h on coverslips in 24-well plates were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.2% TritonX-100 in PBS for 5 min, washed 3 times for 5 min with PBS, blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich, A6793) in PBS for 30 min, incubated with a monoclonal anti-mouse LAMP1 (Abcam, Ab25630, 1:100) overnight at 4 °C and finally with an

Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Life technologies, A-21422, 1:800) for 1 h. After being washed 3 times for 5 min, the cells were analyzed using a confocal microscope.

Mitophagy analysis

Cells (280,000) were plated in Lab-TekTMII chambers (Nunc, 155380) for 24 h and incubated at 37 °C overnight. Cells were stained in fresh complete medium with 50 nM MitoTracker® RedCMXRos (Invitrogen, M7512) and 100 nM LysoTracker® Green (Invitrogen, L-7526) for 45 min in the presence or absence of 10 µM FCCP (Sigma, C2920) for 45 min. Live cells were then analyzed using a Zeiss LSM 710 confocal microscope and the Zen 2008 software. All figures were assembled using Adobe Photoshop CS2 and Adobe Illustrator CS softwares. For mitophagy measurements, red and green pixel intensity overlay was conducted using ImageJ software (Coloc 2) and the Pearson's coefficient.

Flow cytometry

Cells were plated in 6-well plates at a concentration of 600,000 cells per well and incubated at 37 °C overnight. Cells were stained in fresh complete medium with 50 nM MitoTracker® RedCMXRos for 45 min. After 2 PBS washes, cells were trypsinized and resuspended in 200 µl complete medium before being harvested at 5,000 g for 5 min and resuspended in 500 µl PBS. Cells (10,000 events) were then examined using a LSR II Becton Dickinson flow cytometer (UAB Flow Cytometry Core, Birmingham, AL). Data were acquired and analyzed using the Becton Dickinson FACScan Flow Cytometer software.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Student *t* test. Data are expressed as the mean ± SEM.

References

1. Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royce M, Adessi GL. Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 90:R17-21; PMID:8495796; [http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207\(93\)90161-C](http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207(93)90161-C)
2. Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:495-505; PMID:20404487; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.4.11819>
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; <http://dx.doi.org/10.1038/16264>
4. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* 2011; 12:226; PMID:21867568; <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2011-12-7-226>
5. Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48; PMID:15530441; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.072>
6. Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:7983-93; PMID:16431922; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509805200>
7. Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of gabarap, *gac1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1073-1074:83-7; PMID:16458273; <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.004>
8. Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, Jouvenot M. Specific regional distribution of *gac1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15; PMID:18423580; <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.077>
9. Le Grand JN, Bon K, Fraichard A, Zhang J, Jouvenot M, Risold PY, Boyer-Guittaut M, Delage-Mourroux R. Specific distribution of the autophagic protein GABARAPL1/GEC1 in the developing and adult mouse brain and identification of neuronal populations expressing GABARAPL1/GEC1. *PLoS One* 2013; 8:e63133; PMID:23690988; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063133>
10. Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2009; 284:28319-31; PMID:19696026; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.024406>
11. Jamart C, Benoit N, Raymackers JM, Kim HJ, Kim CK, Francaux M. Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 2012; 112:3173-7; PMID:22194006; <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-011-2287-3>
12. Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Expression of *gac1/GABARAPL1* versus *GABARAP* mRNAs in human: predominance of *gac1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 119:216-9; PMID:14625090; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.09.011>
13. Berthier A, Seguin S, Sascio AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafrasse C, Tolle F, Fraichard A, et al. High expression of *gabapap11* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1024-31; PMID:20197771; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605568>
14. De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, et al. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* 2012; 3:e418; PMID:23152054; <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2012.159>
15. von Walden F, Jakobsson F, Edström L, Nader GA. Altered autophagy gene expression and persistent atrophy suggest impaired remodeling in chronic hemiplegic human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2012; 46:785-92; PMID:22996233; <http://dx.doi.org/10.1002/mus.23387>
16. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, Andersen SL, Stephens RM, Benes FM, Sonntag KC. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 2009; 132:1795-809; PMID:19052140; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awn323>
17. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem J* 2012; 441:523-40; PMID:22187934; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20111451>

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

VDU is a member of the Seahorse Biosciences Scientific Advisory Board.

Acknowledgment

Michaël Boyer-Guittaut would like to thank his colleagues from the EA3922 team, Jacques Bahi, president of the Université of Franche-Comté, Abderrazzak Kadmiri, director of UFR-ST of the Université of Franche-Comté and the Université of Franche-Comté for their support during this research project performed at the University of Alabama in Birmingham, AL, USA. Laura Poillet is supported by a fellowship of the Région de Franche-Comté. The authors acknowledge funding from the following sources: Dr Jianhua Zhang was supported by NIH R01-NS064090 and a VA merit award. Flow cytometry was supported by RDCC-APCC core (NIH P30 grant #P30 AR48311). The authors would like to thank Enid F Keyser (UAB Flow cytometry core, Birmingham, AL) for her technical help using the LSR-II Becton Dickinson flow cytometer. Authors are grateful to Jianhua Zhang's and Victor M Darley-Usmar's laboratory members for their technical help, advice, and critical reviewing of this manuscript.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:
www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/28390

60. Rudd LP, Kabler SL, Morrow CS, Townsend AJ. Enhanced glutathione depletion, protein adduct formation, and cytotoxicity following exposure to 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in cells expressing human multidrug resistance protein-1 (MRP1) together with human glutathione S-transferase-M1 (GSTM1). *Chem Biol Interact* 2011; 194:113-9; PMID:21925487; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.08.012>
61. Dickinson DA, Levenon AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM, Forman HJ. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1152-9; PMID:15451055; <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.011>
62. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27:502-22; PMID:4388022; [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5)
63. Knight-Lozano CA, Young CG, Burow DL, Hu ZY, Uyeminami D, Pinkerton KE, Ischiropoulos H, Ballinger SW. Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. *Circulation* 2002; 105:849-54; PMID:11854126; <http://dx.doi.org/10.1161/hc0702.103977>
64. Westbrook DG, Anderson PG, Pinkerton KE, Ballinger SW. Perinatal tobacco smoke exposure increases vascular oxidative stress and mitochondrial damage in non-human primates. *Cardiovasc Toxicol* 2010; 10:216-26; PMID:20668962; <http://dx.doi.org/10.1007/s12012-010-9085-8>
65. Mitchell T, Johnson MS, Ouyang X, Chacko BK, Mitra K, Lei X, Gai Y, Moore DR, Barnes S, Zhang J, et al. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in Akita(+/*Ins2*)-derived β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305:E585-99; PMID:23820623; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2013>

Publication III:

GABARAPL1 mediated-tumor suppressive functions are independent of its conjugation to autophagosomes

Poillet-Perez L., Gauthier T., Hervouet E., Fraichard A., Borg C., Pallandre J.R., Gonzales B., Ramdani Y., Boyer-Guittaut M., Delage-Mourroux.R., Despouy G.

En révision dans le journal *Autophagy* (2015)

GABARAPL1 mediated-tumor suppressive functions are independent of its conjugation to autophagosomes

Poillet-Perez L.,¹ Gauthier T.,² Hervouet E.,¹ Fraichard A.,¹ Borg C.,² Pallandre J.R.,² Gonzalez B.J.,³ Ramdani Y.,³ Boyer-Guittaut M.,¹ Delage-Mourroux.R.,¹ Despouy G.¹

¹ Université de Bourgogne Franche-Comté, « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central » EA3922, 16 route de Gray, 25000 Besançon, France.

² Université de Bourgogne Franche-Comté, « Interaction Hôte-Greffon, Tumeur et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire » UMR1098, 240 route de Dôle, 25000 Besançon, France.

³ Université de Normandie, « Microvascular Endothelium and Neonatal Brain Lesions », Inserm E.R.I 28 NeoVasc, UFR de Médecine et de Pharmacie, 22 boulevard Gambetta 76183 Rouen, France.

*Corresponding author: Gilles Despouy, Ph.D., Université de Bourgogne Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922, SFR FED4234, UFR-ST, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France. Phone: 0033-3-81-66-62-83; Fax: 0033-3-81-66-69-70; Email : gilles.despouy@univ-fcomte.fr

Keywords: Autophagy, breast cancer, GABARAPL1, LC3, LAMP1, MTOR, ULK1, MCF-7

Abbreviations

AMPK, AMP-activated protein kinase; ATG, autophagy-related protein; CQ, chloroquine; BafA1, bafilomycin A1; BSA, bovine serum albumin; DMEM, dulbecco's minimum essential medium; EBSS, earle's balanced salt solution; ECM, extra cellular matrix; FBS, fetal bovine serum; GABA_A, γ -aminobutyric acide, type A; GABARAP, GABA_A receptor-associated protein; GABARAPL1, GABARAPL2, GABA_A receptor-associated protein-like 1 and 2; GATE-16, golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GEC1, glandular epithelial cell protein 1; GFP, green fluorescent protein; HRP, horseradish peroxidase; LAMP1, lysosomal-associated membrane protein 1; MAP1-LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; MCF-7, Michigan cancer foundation; MTOR, mammalian target of rapamycin; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NH₄Cl, ammonium chloride; PBS, phosphate buffer saline; PBS-T, PBS-triton-X; PFA, paraformaldehyde; PVDF, polyvinylidene difluoride; RFP, red fluorescent protein; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecylsulfate; SQSTM1, sequestosome 1; TBS-T, tris buffer saline-tween; ULK1, unc-51 like autophagy activating kinase 1.

Abstract

GABARAPL1 protein belongs to the ATG8 family whose members have been described to be involved in non-selective and selective autophagy. Our laboratory previously demonstrated that GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles and that GABARAPL1 extinction in breast cancer cells leads to a decrease in autophagic flux. Moreover, GABARAPL1 inhibits cancer cell phenotypes *in vitro* as well as tumor growth *in vivo*. In this study, we aimed to determine whether GABARAPL1 conjugation to autophagosomes is necessary for its tumor suppressive functions using breast cancer cell lines (MCF-7) overexpressing wild type or mutant (G116A) GABARAPL1. The characterization of these cell lines led us to the conclusion that the G116A mutation impairs GABARAPL1 lipidation and its association with autophagosomes. Overexpression of GABARAPL1 led to an increase in basal and induced autophagic flux while, overexpression of the mutant G116A led to an increase in basal but not induced autophagic flux. The G116A mutation impaired GABARAPL1 effects on late stages of autophagy, such as autophagosome/lysosome fusion and lysosome activity but did not modify its function on early stages of autophagy, such as MTOR or ULK1 activity. Moreover, the G116A mutation inhibited the effect of GABARAPL1 on several cancer cell phenotypes *in vitro* but did not alter its effect on tumor growth *in vivo*. When put together, our results demonstrate for the first time that GABARAPL1 present different regulatory functions during early and late stages of autophagy independently or not of its conjugation to autophagosomes but its tumor suppressive function appeared independent of its conjugation.

Introduction

Macroautophagy (hereafter called autophagy) is a cellular degradation process in which damaged proteins, organelles and other cytoplasmic constituents are degraded and recycled to provide nutrients and energy.^{1, 2} This process is characterized by the engulfment of portions of the cytosol, soluble proteins and/or organelles into a unique double membrane structure called the phagophore. The phagophore elongates and closes to generate a double-membrane organelle called the autophagosome which then fuses with the lysosome to form the autophagolysosome, leading to the degradation of its contents by lysosomal hydrolases.^{3, 4} This mechanism occurs at low basal levels to maintain cellular homeostasis and can be induced by different stresses such as hypoxia or nutrient starvation to allow cell survival. These stresses induce different signalling pathways such as MTORC1 (mammalian target of rapamycin complex), an autophagy inhibitor, or AMPK (AMP-activated protein kinase), an inducer of autophagy. MTORC1 and AMPK then activate the same protein called ULK1/Atg1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) to modulate autophagy following nutrient or energy starvation. During nutrient-rich conditions, MTORC1 is associated with the ULK1 complex and inhibits autophagy through the phosphorylation of ULK1 at Ser 757. Nutrient starvation leads to the inhibition of MTORC1, activation of ULK1 and subsequent induction of autophagy.^{5, 6} During nutrient or energy starvation, AMPK can inhibit MTORC1 and activate ULK1 through phosphorylation at several sites such as Ser 317, 555 and 777 leading to the induction of autophagy.⁷⁻⁹

The autophagy process is mediated by more than 30 autophagy-related (ATG) proteins. Among these proteins, GABARAPL1/GEC1 (GABA_A receptor-associated protein-like 1/Glandular epithelial cells 1), which was first described in our group as an estrogen regulated gene, belongs to the ATG8 family.¹⁰ GABARAPL1 is a member of the GABARAP (GABA_A receptor-associated protein) subfamily, one the 2 subfamilies of the ATG8 family which included also the MAP-LC3 (microtubule-associated light chain-3) subfamily. The GABARAP subfamily, in addition to GABARAPL1, includes GABARAP and GABARAPL2/GATE-16 (GABARAP like-2 protein/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa), which share 87% and 61% identity with GABARAPL1, respectively.¹¹⁻¹³ The GABARAPL1 protein is composed of 117 amino acids and has been initially involved in the protein intracellular transport through its interaction with

the GABA_A receptor, the κ opioid receptor and TUBULIN.^{14, 15} GABARAPL1 also interacts with HSP-90 (Heat shock protein 90) which impairs its degradation by the proteasome.¹⁶

The members of ATG8 family possess a conserved C-terminal glycine at position 116 (GABARAP family) or 120 (LC3 family) essential for their conjugation to autophagosomes and their role in autophagy.¹⁷ Indeed, during autophagy, GABARAPL1, like the other members of ATG8 family, is cleaved by the protease ATG4B to expose its C-terminal glycine and give the cytosolic mature form called GABARAPL1-I.¹⁸ During phagophore elongation, this cytosolic form is linked to phospholipids by ATG7 (E1-like) and ATG3 (E2-like) enzymes to give the membrane-associated form, called GABARAPL1-II.¹⁹⁻²³ This lipidation induces the relocalization of GABARAPL1 at the autophagosomes.²³

Despite their similarity, GABARAP and LC3 subfamily members are suspected to be involved at different stages of the autophagic process. In fact, the LC3 subfamily could be necessary for the elongation of the phagophore whereas the GABARAP subfamily could be necessary for the maturation of the autophagosome.²⁴ We have previously demonstrated that a cellular knock-down of GABARAPL1 decreased autophagic flux and lysosome number in the breast cancer cell line MDA-MB-436.²⁵ This knock-down also led to an increase in glutathione, ATP, basal respiration and accumulation of damaged mitochondria suggesting a function of GABARAPL1 in mitochondrial homeostasis and metabolic reprogramming. Moreover, GABARAPL1 has been shown to interact with AMPK (unpublished data) and with ULK1 suggesting a potential involvement of this protein during the early stages of autophagy, as well.²⁶

27

The ATG8 family have also been described to be involved in “selective autophagy” which targets defined cargo for degradation.²⁸ ATG8 proteins indeed interact with cargo proteins *via* their LIR motif (LC3-interacting region) to deliver ubiquitinated contents to the autophagosomes for their degradation.^{29, 30} For example, GABARAPL1 interacts with SQSTM1/P62 (sequestosome 1) or NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) to induce the degradation of ubiquitinated proteins aggregates and with NIX to activate the degradation of damaged mitochondria during a process called mitophagy.³¹⁻³³

Deregulation of autophagy has been described to be involved in various diseases including cancer.³⁴ However, autophagy presents a double edge-sword in

cancer since it can act as a tumor-suppressing or a tumor-promoting process depending on tumor type and stage.³⁵⁻³⁷ During the early stages of tumorigenesis, autophagy acts as a tumor suppressor mechanism by limiting DNA damage, chromosome instability, oxidative stress and inflammation which are oncogenic stimulus.^{38, 39} Moreover, the expression of proteins involved in autophagy such as BECN1 (BECLIN-1), ATG5, UVRAG, GABARAP and LC3 are reduced or lost in several types of cancers.⁴⁰⁻⁴⁴ On the contrary, during the late stages of tumorigenesis, cancer cells present elevated autophagy allowing them to survive against metabolic stress. Indeed, the microenvironment of cancer cells presents reduced levels of nutrients, oxygen and growth factors leading to an altered metabolism and an impairment of ATP production.^{45, 46}

Numerous studies have highlighted a role of GABARAPL1 as a tumor suppressor. We have previously shown in our laboratory that cancer cell lines present a reduced *GABARAPL1* expression compared to normal cells and that a high *GABARAPL1* expression is correlated with a good prognosis in breast cancer patients.^{47, 48} Moreover, we and others have demonstrated that GABARAPL1 overexpression inhibits cell proliferation, colony formation and invasion of breast cancer cells *in vitro*.^{25, 47} These results are consistent with those recently demonstrating that GABARAPL1 expression is decreased in hepatocellular carcinoma (HCC) compared to adjacent liver tissue and that GABARAPL1 inhibits cell growth of HCC cancer cell lines.⁴⁹ It has also been shown that GABARAPL1 overexpression inhibits tumor growth *in vivo* and mediate the degradation of DVL2 (Dishevelled 2) through selective autophagy leading to the inhibition of the Wnt pathway whose deregulation has been described to be involved in various diseases such as cancer.⁵⁰

Given the function of GABARAPL1 in autophagy and cancer, two mechanisms closely linked, the purpose of our study was to : i) study the role of GABARAPL1 during early and late stages of autophagy and, ii) determine the involvement of GABARAPL1 conjugation to autophagosomes in its tumor suppressive functions. To do so, we used the breast cancer cell line MCF-7 overexpressing GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A protein in which the essential C-terminal glycine at position 116 was replaced by an alanine.

Results

The G116A mutation impaired the conjugation of GABARAPL1 to phospholipids and its recruitment to autophagosomes

In order to determine the importance of the GABARAPL1 conjugation to autophagosomes on its tumor suppressive functions, we designed MCF-7 breast cancer cell lines overexpressing Flag:GABARAPL1:6His (GABARAPL1) or Flag:GABARAPL1-G116A:6His mutant clone 1 and clone 2 (GABARAPL1 G116A c1 and c2) (**Fig. 1A**). First, we characterized our cell lines by studying GABARAPL1 expression at protein and mRNA levels. As expected, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A expression were detected in MCF-7 GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells but not in control cells transfected with the void vector (**Fig. 1B-C**). Interestingly, we noted that MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 cells showed a GABARAPL1 protein expression similar to the one observed in MCF-7 GABARAPL1 cells whereas MCF-7 GABARAPL1 G116A c2 cells presented a lower GABARAPL1 protein expression.

Our laboratory has previously reported that, during autophagy, GABARAPL1 is cleaved depending on its C-terminal glycine and is then associated with autophagic vesicles in HEK-293 cells.²³ We wanted to know whether G116A mutation impairs lipidation of GABARAPL1 and its localization to autophagosomes in MCF-7 cells. We studied GABARAPL1 expression in our different cell models after treatment with NH₄Cl, a lysosomal activity inhibitor which led to the accumulation of lipidated form of GABARAPL1 called GABARAPL1-II.²³ Without treatment, only the GABARAPL1-I form (19 kDa) was detected in MCF-7 GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells (**Fig. 1D**). As expected, in MCF-7 GABARAPL1 cells, NH₄Cl treatment led to an increase in GABARAPL1-II form (16 kDa) but this treatment had no effect on MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. These results clearly demonstrated that the G116A mutation impairs the lipidation of GABARAPL1. Next, we studied the localization of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A after treatment with BafilomycinA1 (BafA1), an inhibitor of autophagosome/lysosome fusion. Without treatment, MCF-7 GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A cells presented a diffuse GABARAPL1 staining in the cytoplasm (**Fig. 1E top**). As expected, treatment with BafA1 led to an accumulation of GABARAPL1 punctuations around the nucleus in

MCF-7 GABARAPL1 cells, indicating a relocation of GABARAPL1 to autophagosomes. On the contrary, treatment of MCF-7 GABARAPL1 G116A cells with BafA1 did not lead to any accumulation of GABARAPL1 punctuation, demonstrating that the GABARAPL1 mutant was unable to associate with autophagic vesicles (**Fig. 1E top**). Similar results were obtained after treatment with EBSS, an inducer of autophagy, in the presence or absence of BafA1 (**Fig. 1E bottom**). Indeed, treatment with EBSS increases intensity of GABARAPL1 staining in MCF-7 GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. As previously shown, addition of BafA1 leads to an accumulation of GABARAPL1 punctuations in MCF-7 GABARAPL1 cells but not in MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells.

In order to study the effect of G116A mutation on other characteristics of GABARAPL1 which were suspected to be independent of its conjugation to autophagosomes, we studied the impact of this mutation on the interaction of GABARAPL1 with TUBULIN and GABARAPL1 degradation by the proteasome.^{14, 16} Firstly, we studied the interaction between GABARAPL1 and TUBULIN using a recent technique called P-LISA (Proximity Ligation In Situ Assay), which allows the quantification of stable and transient interactions of endogenous proteins *in situ*.⁵¹ Our experiments showed that GABARAPL1 G116A exhibited a similar level of interaction with TUBULIN than GABARAPL1 suggesting that the G116A mutation did not impair GABARAPL1/TUBULIN interaction (**Fig. 1F**). Secondly, we studied the GABARAPL1 expression [exogenous Flag:GABARAPL1:6His or Flag:GABARAPL1-G116A:6His expression (19 kDa) and endogenous GABARAPL1 expression (16 kDa)] in our different cell models after treatment with MG132, a proteasome inhibitor (**Fig. 1G**). As expected, MG132 treatment led to an increase in exogenous and endogenous GABARAPL1 expression levels in MCF-7 GABARAPL1 cells. Similar results were obtained in MCF-7 GABARAPL1 G116A cells, suggesting that the G116A mutation did not impair its degradation by the proteasome. These results suggested that the G116A mutation specifically altered the GABARAPL1 conjugation to autophagosomes without affecting others characteristics of this protein.

The G116A mutation impaired the effect of GABARAPL1 on induced but not basal autophagy

We then wanted to investigate, in a prospective study, the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on autophagy by identifying autophagic

vesicles using electron microscopy (**Fig. 2A**). Overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A led to an increase in autophagic vesicles (Av) and lysosome (Lys) compared to the control cells. Surprisingly, these results suggested that GABARAPL1 G116A, like GABARAPL1 might regulate autophagy induction.

Given these results, we next wanted to study the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A on autophagic flux. Indeed, our laboratory has previously shown that knock down of GABARAPL1 decreased autophagic flux in MDA-MB-436 cells.²⁵ During autophagy, LC3 is cleaved and linked to a phospholipid at the autophagosome to give the membrane-associated form LC3-II. The amount of this protein is directly correlated with the number of autophagosomes. We therefore analyzed the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on LC3-II protein levels. Without treatment, overexpression of GABARAPL1 led to an increase in LC3-II protein compared to the control cell lines. On the contrary, overexpression of GABARAPL1 G116A did not regulate the level of LC3-II (**Fig. 2B, lanes 1-4-7-10**). Since, the amount of LC3-II is not related to the autophagic flux but represents the number of autophagosomes at a particular time point, an increase in LC3-II might either indicate an increase in autophagic flux or a decrease in autophagolysosome degradation. In order to study autophagic flux, we compared the amount of LC3-II in the presence or absence of BafA1 (**Fig. 2B, lanes 2-5-8-11**) or Chloroquine (CQ) (**Fig. 2B, lanes 3-6-9-12**), two inhibitors of autophagosome/lysosome fusion. Treatment with BafA1 and CQ led to a greater increase in LC3-II protein level in MCF-7 GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells compared to the control cells, suggesting an increased autophagic flux in these cells. These results suggested that GABARAPL1 might increase basal autophagic flux independently of its conjugation to autophagosomes. The effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A on induced autophagy following treatment with EBSS was then studied (**Fig. 2C**). After treatment with EBSS, overexpression of GABARAPL1 led to an increase in LC3-II levels compared to the control cells whereas overexpression of GABARAPL1 G116A did not. Combination of EBSS with BafA1 led to a greater increase in LC3-II levels in MCF-7 GABARAPL1 cells compared to the control cells, suggesting an increased autophagic flux. Interestingly, after treatment with EBSS and BafA1, MCF-7 GABARAPL1 G116A cells exhibited LC3-II levels similar to those observed in control cells suggesting that GABARAPL1 increased induced autophagic flux depending on its conjugation to autophagosomes.

In order to confirm these results, we used a double-tagged GFP-RFP-LC3

construct and study the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on autophagosomes and autophagolysosomes number.⁵² Since the GFP fluorescence is sensitive to acidic and proteolytic conditions found in lysosomes whereas the RFP fluorescence remains stable, this construct allows the discrimination of autophagosomes (RFP+/GFP+) and autophagolysosomes (RFP+/GFP-). Therefore, an increase in autophagic flux would result in a concomitant increase of red and yellow punctuations. We used CQ as a negative control of this experiment. In fact, the use of CQ led to an increase in yellow punctuations but not red punctuations indicating a blockade of autophagic flux (**Fig. S1**). Without treatment, overexpression of GABARAPL1 did not modify the number of autophagosomes and autophagolysosomes compared to the one observed in control cells whereas overexpression of GABARAPL1 G116A increased autophagosomes and autophagolysosomes number (**Fig. 2D left**). These results suggested that GABARAPL1 G116A increased the basal autophagic flux. We next studied the number of autophagosomes and autophagolysosomes during induced autophagy. After treatment with EBSS, overexpression of GABARAPL1 led to a greater increase in autophagic flux, characterized by an increase in autophagosomes and autophagolysosomes number (**Fig. 2D right**). On the contrary, after treatment with EBSS, overexpression of GABARAPL1 G116A led to a similar number of autophagosomes and autophagolysosomes compared to the one observed in control cells suggesting that GABARAPL1 increased induced autophagic flux depending on its conjugation to autophagosomes. These results confirmed those obtained previously by western blotting and suggested that GABARAPL1 seemed to present different functions in autophagy which are dependent or independent of its conjugation to autophagosomes.

It has been previously shown that GABARAPL1, like the other members of ATG8 family, interacts with SQSTM1 during selective autophagy.²⁹ In fact, SQSTM1 recognizes ubiquitinated aggregates and then interacts with ATG8 proteins localized at the autophagosome membrane to facilitate degradation of their content. We analyzed the interaction between SQSTM1 and GABARAPL1 in MCF-7 GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A cells using P-LISA (**Fig. 2E**). Without treatment, GABARAPL1 G116A did not interact with SQSTM1. The signal obtained seemed to represent the interaction between SQSTM1 and endogenous GABARAPL1 as observed in MCF-7 control cells. As expected, treatment with EBSS and BafA1 led to an increased

interaction of SQSTM1 with GABARAPL1 but not with GABARAPL1 G116A suggesting that SQSTM1 could only interact with GABARAPL1 localized in autophagosomes. These results suggested that the G116A mutation impaired GABARAPL1 function in selective autophagy.

The G116A mutation impaired GABARAPL1 functions during late stages of autophagy

During the late stages of autophagy, a mature autophagosome fuses with a lysosome, a digestive organelle with an acidic lumen, to allow protein degradation and turnover. We previously reported that a knock-down of GABARAPL1 in MDA-MB-436 cells led to a decreased number of lysosomes compared to the control cells.²⁵ The effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression on lysosome acidification was then studied using LysoTracker, a fluorescent dye which specifically label acidic compartments including lysosomes. Confocal microscopy analysis showed that overexpression of GABARAPL1 led to an increase in LysoTracker fluorescence suggesting an increase in lysosomal acidification (**Fig. 3A**). On the contrary, overexpression of GABARAPL1 G116A did not change the LysoTracker fluorescence compared to the one observed in control cells. Treatment with EBSS led to an increase in LysoTracker fluorescence in control cells and cells overexpressing GABARAPL1 G116A. Interestingly, treatment with EBSS did not modify LysoTracker fluorescence in cells overexpressing GABARAPL1. These results suggested that GABARAPL1 increased the acidification of lysosome depending on its conjugation to autophagosomes. These results were confirmed by the quantification of LysoTracker red fluorescence using a flow cytometer (**Fig. 3B**). Since an increase in lysosomal acidification could be linked to an increase in lysosomal number, we then studied the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on LAMP1 (Lysosome associated membrane protein 1) protein expression, a lysosomal marker. Our results showed that overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A did not significantly modify the levels of LAMP1 compared to those observed in control cells (**Fig. 3C**). This result was confirmed by the observation of lysosomes using confocal microscopy. Indeed, overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A did not alter the fluorescence intensity of LAMP1 (**Fig. 3D**).

The lysosome is a digestive organelle with an acidic lumen containing hydrolases such as cysteine cathepsins which are involved in the intracellular protein

degradation and turnover. We next studied the activity of CATHEPSIN B during basal and induced autophagy using MagicRed (MR) (**Fig. 3E**). An increased MR fluorescence would be associated with an increased processing and activation of CATHEPSIN B. Overexpression of GABARAPL1 led to an increase in MR fluorescence whereas overexpression of GABARAPL1 G116A led to MR fluorescence similar to the one observed in control cells. Moreover, during EBSS treatment, overexpression of GABARAPL1 led to a further increase in MR fluorescence compared to the one observed in the other cell lines (**Fig. 3E**). These results suggested that the increase in lysosomal acidification observed in MCF-7 GABARAPL1 cells could be due to an increase in CATHEPSIN B activity. But, an increased lysosomal activity could also be due to an increased autophagosome/lysosome fusion.⁵³ We then studied the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on GFP-LC3/LAMP1 colocalization, an event correlated with autophagosome/lysosome fusion (**Fig. 3F**). Overexpression of GABARAPL1 led to an increase in GFP-LC3/LAMP1 colocalization compared to control cells whereas overexpression of GABARAPL1 G116A did not increase GFP-LC3/LAMP1 colocalization. EBSS treatment leads to an increase in GFP-LC3/LAMP1 colocalization in control cells and cells overexpressing GABARAPL1 G116A. In cells overexpressing GABARAPL1, treatment with EBSS did not further modify GFP-LC3/LAMP1 colocalization. These results suggested that GABARAPL1 increased autophagosome/lysosome fusion depending on its conjugation to autophagosomes. This increased autophagosome/lysosome fusion could also explain the increased lysosomal acidification observed in MCF-7 GABARAPL1 cells.

The G116A mutation did not impair GABARAPL1 functions during early stages of autophagy

Since it has been previously shown that GABARAPL1 interacts with ULK1, a protein involved in initial events of autophagosome formation, we then studied the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression during the early stages of autophagy and particularly MTOR, a well-known ULK1 inhibitor and autophagy inhibitor.^{26, 27} Without treatment overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A did not significantly modify MTOR phosphorylation (**Fig. 4A**). Moreover, treatment with EBSS led to the same decrease in MTOR phosphorylation in MCF-7 GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. We therefore studied the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression on the phosphorylation of

P70S6K (p70S6 kinase), a MTOR target (**Fig. 4B**). Without treatment, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A led to a decreased phosphorylation of P70S6K compared to control cells suggesting that GABARAPL1 inhibited P70S6K activity and hence MTOR activity independently of its conjugation to autophagosomes. Treatment with EBSS led to a strong decrease in P70S6K phosphorylation in our cell lines. Since ATG8 family members and more particularly GABARAP family proteins have been described to interact with ULK1 and allow its conjugation to autophagosomes,²⁶ we examined the phosphorylation of ULK1 at Ser 555 which has been described to be necessary for autophagy induction.⁸ Without treatment, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A led to an increased phosphorylation of ULK1 (**Fig. 4C**). Treatment with EBSS led to a complete decrease in ULK1 phosphorylation in all cell lines. These results suggested that GABARAPL1 could regulate autophagic flux by acting during early stages of this process independently of its conjugation to autophagosomes.

The G116A mutation modified the effect of GABARAPL1 on some cancer cell phenotypes *in vitro* but not on tumor growth *in vivo*

Since *GABARAPL1* has been previously described as a tumor suppressor gene, we wondered whether the role of GABARAPL1 in cancer was dependent on its conjugation to autophagosomes. To answer this question, we examined the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on cancer cell phenotypes. As previously shown, overexpression of GABARAPL1 led to a decrease in cell proliferation. However, overexpression of GABARAPL1 G116A led to a cell proliferation similar to those obtained in control cells (**Fig. 5A**). This conclusion was the same regarding other studied cancer cell phenotypes such as clonogenicity, cell adhesion, anchorage independent-cell proliferation and invasion (**Fig. 5B-E**). However, different results were obtained regarding cell migration. Indeed, overexpression of GABARAPL1 decreased cell migration studying by transwell assay, but surprisingly, overexpression of GABARAPL1 G116A also led to a decrease in cell migration (**Fig. 5F**). In order to confirm these results, we studied cell migration using a wound healing assay. This experiment led to similar results, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A both decreased migration (**Fig. 5G**). These

results suggested that GABARAPL1 conjugation to autophagosomes could be necessary for its role in some but not all cancer cell phenotypes *in vitro*.

In order to resolve the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A in cancer, we studied the tumor growth *in vivo* after injection of MCF-7 C, GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A cells into Rag γ/c mice. The tumor size was monitored during two months following injection. According to previous results, overexpression of GABARAPL1 decreased the size and the growth of the tumors formed (**Fig. 6A**).⁵⁰ Surprisingly, overexpression of GABARAPL1 G116A also led to a significant decrease in the tumor growth. Next, we wanted to confirm GABARAPL1 expression levels in our tumors (**Fig. 6B**). MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 cells showed a GABARAPL1 staining similar to those observed in MCF-7 GABARAPL1 cells whereas MCF-7 GABARAPL1 G116A c2 cells presented a lower GABARAPL1 staining. These results were consistent with those described above *in vitro*. Interestingly, we noted that GABARAPL1 expression levels seemed to be inversely correlated with tumor growth. Moreover, only MCF-7 GABARAPL1 cells show GABARAPL1 punctuation. These results suggested that GABARAPL1 could inhibit tumor growth independently of its conjugation to autophagosomes.

Discussion

In this study, we demonstrated that GABARAPL1 plays a major role during late stages of autophagy, as previously described by others,²⁴ but can regulate early steps of autophagy, as well. But, we showed that these two functions do not necessarily require the conjugation of GABARAPL1 to autophagosomes and more interestingly, we demonstrated that tumor suppressive functions of GABARAPL1 seem to be independent of its conjugation to autophagosomes (**Fig. 7**).

GABARAPL1 belongs to the ATG8 family whose function in autophagy has been far less studied than the one linked to the members of the other family, LC3. During autophagy, GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles and acts with other GABARAP family members to regulate autophagosome maturation.^{23, 24} Moreover, GABARAPL1, previously described as a tumor suppressor protein, inhibits cancer cell phenotypes *in vitro* as well as tumor growth *in vivo*.^{25, 47, 50} Previous studies have described that GABARAPL1 tumor suppressive functions depends on selective autophagy since it can mediate the inhibition of the Wnt pathway *via* the degradation of its activator DVL2.⁵⁰

So, we investigated the role of GABARAPL1 conjugation to autophagosomes on its tumor suppressive functions using breast cancer cell line. We therefore designed two *in vitro* models: one MCF-7 cell line stably overexpressing GABARAPL1 and two stably overexpressing GABARAPL1 G116A mutant protein which is no longer able to be linked onto phospholipids.²³ We first confirmed that, in our models, the G116A mutation indeed impaired the lipidation and association of GABARAPL1 with autophagosomes (**Fig. 1D-E**). Our data are consistent with previous studies describing similar results for the G120A mutation in LC3 or the G116A mutation in GABARAP or GABARAPL2/GATE-16.^{19, 21, 54} However, no study has ever analyzed the effect of these C-terminal mutations on the role of ATG8 family members in autophagy and cancer. These previous studies have only investigated the requirement for the C-terminal processing of GABARAP family members on their function in intracellular transport. In fact, it has been shown that the G116A mutation did not alter the interaction of GABARAP with the AT(1)R (rat angiotensin type-1A receptor) but prevented its interaction with the GABA_A receptor.^{55, 56} A second study has demonstrated that the G116A mutation impaired the interaction of GABARAP, but not GABARAPL1, with the hKOPR (human κ opioid receptor).⁵⁷ In our study, we

demonstrated that the G116A mutation did not regulate the interaction of GABARAPL1 with TUBULIN and its degradation by the proteasome (**Fig. 1F-G**), two mechanisms described to be independent of its role during autophagy, suggesting that the G116 mutation specifically disrupted the conjugation of GABARAPL1 to autophagosomes and its role in autophagy.

GABARAPL1, like the other members of the ATG8 family, can interact with SQSTM1 to enhance the degradation of ubiquitinated aggregates through selective autophagy.²⁹ In our models, the G116A mutation impaired the interaction of GABARAPL1 with SQSTM1 (**Fig. 2E**), suggesting that this protein only interacts with GABARAPL1 when it is localized at the surface of the autophagosomes and that the processing of GABARAPL1 is required for its function during selective autophagy. These results are congruent with data demonstrating that an ATG4B mutant or the mutant LC3 G120A, which both impaired the maturation and lipidation of LC3, inhibited the interaction of LC3 and SQSTM1; suggesting that SQSTM1 preferentially interacted with LC3-II, the lipidated form of LC3, to be efficiently recruited to the autophagosomes and transported into autophagolysosomes.^{58, 59} Interestingly, it has been also demonstrated that the mutation of the LC3-binding site in SQSTM1 (called LIR motif) inhibited the SQSTM1-LC3 interaction and inhibited the degradation of specific substrates through selective autophagy without affecting overall autophagy.⁶⁰ These results are consistent with our data and confirm that the processing of GABARAPL1, like those of other ATG8 family members, is important for its function in selective autophagy. During selective autophagy, GABARAPL1 can also interact with other adapters proteins, such as NBR1 or NIX, to induce the specific degradation of ubiquitinated aggregates or damaged mitochondria, respectively.^{31, 32} In order to complete this study on the involvement of the lipidation of GABARAPL1 during selective autophagy, such as mitophagy, it would be interesting to study the effect of the G116A mutation on its interaction with NBR1 and NIX and quantify overall mitochondria degradation as well as mitochondrial metabolism. These data would allow us to confirm our previous results demonstrating that the knock-down of GABARAPL1 in MDA-MB-436 led to a decrease in mitochondrial quality and homeostasis.²⁵

In the same study, we have demonstrated that a knock-down of GABARAPL1 led to a decrease in basal autophagic flux which could be linked to a decrease in lysosome number.²⁵ As expected, overexpression of GABARAPL1 in MCF-7 led to an

increase in basal autophagic flux. Surprisingly, overexpression of the GABARAPL1 G116A mutant led to a similar result suggesting that the function of GABARAPL1 in basal autophagy might be independent of its conjugation to autophagosomes (**Fig. 2B and D**). We then wondered whether this function could be associated to its role during the early steps of autophagy. We showed that GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A both increased ULK1 phosphorylation and reduced MTOR activation (**Fig. 4**). These data are coherent with the literature since it has been described that ULK1 inhibits MTOR through the phosphorylation of RAPTOR inducing a positive regulatory loop of autophagy induction.⁶¹ We therefore suggested that GABARAPL1, through its interaction with ULK1,^{26, 27} could activate this protein leading to the subsequent inhibition of MTOR. Moreover, it has also been shown in the laboratory that GABARAPL1 can interact with AMPK (unpublished data), which has been previously shown to inhibit mTOR and activate ULK1 by phosphorylation.^{5, 8, 62} Our results are therefore in agreement with previous studies suggesting a link between basal autophagy and MTOR activity.⁶³

We then used an EBSS treatment to study the effect of the G116A mutation during induced autophagy. Following EBSS treatment, overexpression of GABARAPL1, but not GABARAPL1 G116A, led to an increase in autophagic flux suggesting that the role of GABARAPL1 during induced autophagy is dependent on its conjugation to autophagosomes (**Fig. 2C-D**). This function could be associated with its role in late stages of autophagy. Indeed, overexpression of GABARAPL1, but not GABARAPL1 G116A, led to an increased lysosomal activity and autophagosome/lysosome fusion (**Fig. 3**). These results are in agreement with the literature suggesting that the GABARAP family members act during the late stages of autophagosome maturation whereas the LC3 family members are more involved in the elongation of the phagophore membrane.²⁴ Recently, it has been demonstrated that ATG8 family members, localized at autophagosomes, could favor autophagosome/lysosome fusion through their interaction with the protein PLEKHM1 (pleckstrin homology domain containing, family M [with RUN domain] member 1) at the lysosomal surface.^{64, 65} It has been also demonstrated that member of GABARAP family could recruit PI4KII α (Phosphatidylinositol 4-kinase II α) to autophagosomes leading to the generation of PI4P (Phosphatidylinositol 4-phosphate) which is a critical step necessary for autophagosome/lysosome fusion.⁶⁶ These observations could explain the increase in lysosome activity and autophagosome/lysosome fusion

observed in the presence of the membrane-bound GABARAPL1 but not the cytosolic GABARAPL1 G116A. Moreover, GABARAPL1 is known to interact with microtubules and favor their polymerization¹⁴ and microtubules have been shown to regulate autophagosome/lysosome fusion by relocalizing these organelles to the juxta-nuclear region during autophagy.^{67, 68} We could then hypothesize that GABARAPL1, but not GABARAPL1 G116A, could improve microtubules polymerization and therefore facilitate the transport of autophagosomes and lysosomes to the juxta-nuclear region to lead to increased autophagosome/lysosome fusion. Moreover, during autophagy, lysosome activation has been described to require two mechanisms: MTOR inhibition and autophagosome/lysosome fusion.⁵³ In fact, MTOR not only presents an inhibitory effect on ULK1 during early stages of autophagy but also inhibits late stages of autophagy through the inhibition of lysosomal function. These data could explain the increased lysosome activity observed in GABARAPL1 overexpressing cells which might present both MTOR inhibition and increased autophagosome/lysosome fusion whereas GABARAPL1 G116A overexpressing cells would only display MTOR inhibition.

Altogether, our results therefore suggested that GABARAPL1 could act during early and late steps of autophagy, functions which are either dependent or independent of its conjugation to autophagosomes. Since GABARAPL1 has also been described as a tumor suppressor protein in breast cancer, we then wondered whether: i) autophagy is involved in tumor suppressive functions of GABARAPL1 and, ii) tumor suppressive functions of GABARAPL1 require its conjugation to autophagosomes. *In vitro*, overexpression of GABARAPL1 led to an inhibition of cancer cell phenotypes (proliferation, clonogenicity and invasion) which confirmed previous data obtained in the laboratory (**Fig. 5A-G**).^{25, 47} Interestingly, the G116A mutation impaired tumor suppressive functions of GABARAPL1 on almost all phenotypes apart from migration (**Fig. 5A-G**) suggesting that GABARAPL1 could act in cancer cells through different pathways which might be dependent or independent of its conjugation to autophagosomes. Nevertheless, results obtained for cell migration are congruent with those previously published and suggesting that increased autophagy, through inhibition of MTOR, can reduce migration of HeLa cells by regulating cell surface expression of β 1-INTEGRIN.⁶⁹

In order to resolve the effect of GABARAPL1 conjugation to autophagosomes on cancer progression *in vivo*, we studied tumor growth after injection of GABARAPL1

and GABARAPL1 G116A overexpressing cells into Rag γ/c mice (**Fig. 6A**). Overexpression of GABARAPL1 led to a decrease in tumor size confirming previous results obtained in *nude* mice.⁵⁰ Overexpression of GABARAPL1 G116A also led to a decrease in tumor growth suggesting that GABARAPL1 conjugation to autophagosomes is not necessary for its tumor suppressive functions, at least *in vivo*. Moreover, given that GABARAPL1 G116A, which cannot interact with SQSTM1, still presented a tumor suppressor role, we might think that GABARAPL1 function in selective autophagy is not essential for its tumor suppressive function. GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A could present a tumor suppressor role through the inhibition of MTOR which has been previously shown to be involved in cell proliferation and tumor progression.⁷⁰⁻⁷² Furthermore, we could not exclude that GABARAPL1 could present a tumor suppressor role through functions completely independent of its role in autophagy. For example, this is the case for BECN1, which is a protein involved in the initiation of autophagy and a tumor suppressor gene frequently deleted or downregulated in cancer.^{42, 73, 74} Indeed, it has been shown that BECN1 can inhibit tumorigenesis through the inhibition of MCL-1 stabilization or WNT1 (wingless-type MMTV integration site family, member 1) activation, two mechanisms independent of autophagy.^{75, 76}

Our results demonstrate for the first time that GABARAPL1 can act during early and late steps of autophagy, independently or not of its conjugation to autophagosomes, respectively. We also showed that its conjugation to autophagosomes as well as its functions during late stages of autophagy and selective autophagy is not required for its tumor suppressive functions *in vivo* (**Fig. 7**).

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Earle's balanced salt solution (EBSS, E3024), bafilomycin A1 (B1793), chloroquine (C6628), MG132 (C2211) and NH₄Cl (A0171) were purchased from Sigma-Aldrich. For the western blotting experiments, the following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Proteintech, 11010-1-AP, 1:1000), polyclonal anti-LC3 (Sigma-Aldrich, L8918, 1:3000), monoclonal anti-LAMP1 (Abcam, Ab25630, 1:1000), monoclonal anti-MTOR (Cell signaling, #2983, 1:1000), polyclonal anti-phospho-MTOR (Cell signaling, #2974, 1:1000), polyclonal anti-P70S6K (Cell signaling, #9202, 1:1000), polyclonal anti-phospho-P70S6K (Cell signaling, #9205, 1:1000), monoclonal anti-phospho-ULK1 (Ser555) (Cell signaling, #5869, 1:1000), polyclonal anti-ACTIN (Sigma-Aldrich, A5060, 1:15000), polyclonal anti-rabbit (P.A.R.I.S, BI2407, 1:10000) and polyclonal anti-mouse (P.A.R.I.S, BI24130, 1:10000). For the immunofluorescence and P-LISA experiments, the following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Proteintech, 11010-1-AP, 1:200), monoclonal anti-LAMP1 (Abcam, Ab25630, 1:100), monoclonal anti-SQSTM1 (Santa Cruz, sc-28359), Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Life technologies, A-21422, 1:800), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Life technologies, A-11008, 1:800) and polyclonal anti-rabbit FITC (P.A.R.I.S, BI2107, 1:200).

Cell culture and treatment

MCF-7 control cells (C), MCF-7 Flag:GABARAPL1:6His (GABARAPL1) and MCF-7-Flag:GABARAPL1-G116A:6his (GABARAPL1 G116A c1 and c2) were cultured in dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (PAA, E15-891) supplemented with 100 µg/ml penicillin/streptomycin (PAA, P11-010) and 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA, A15-101) in a 5 % CO₂ incubator at 37°C. To inhibit autophagosome/lysosome fusion, cells were incubated for 2 h in complete medium supplemented with 100 nM bafilomycin A1 or 40 µM chloroquine or 50 mM NH₄Cl. To induce autophagy, cells were incubated in EBSS for 4h at 37°C. To inhibit proteasome degradation, cells were cultured in complete medium supplemented with 2 µM MG132 for 16h.

Western blotting

Cells were scraped, harvested and lysed in SB1X. Protein lysates were sonicated for 5 s before loading (Sonics and Materials), separated on a 10 or 12.5 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before being transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, 162-0177). The membrane was blocked with 5 % nonfat milk in Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) and incubated with primary antibodies at the previously indicated dilutions. Immunoreactive bands were detected using goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies and the *p*-coumaric acid- enhanced chemiluminescent (PCA-ECL) solution⁷⁷ and were analyzed using the ChemiDoc XRS+ system (Biorad).

RT-PCR

Total RNAs were extracted as previously described.⁷⁸ For RT-PCR analysis, 2 µg of total RNAs were reverse transcribed using the RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase to obtain cDNA (Sigma, M1302). The exogen GABARAPL1 primers sequence (Flag:GABARAPL1:6His) were: T7 sense 5'-TAAATACGACTCACTATAGGG-3' and BamH1 reverse 5'-CGCGGATCCGCCTTTCCCATAGACACTCTC-3' and the following primers sequence were used for GAPDH: GAPDH S 5'-GCGAGATCCCTCCAAAATCA-3' and GAPDH R 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. DreamTaq DNA polymerase (Life technologies, EP0711) was used to amplify GABARAPL1 and GAPDH from the template cDNA. GAPDH was used as an internal control. Polymerase chain reaction was performed for 35 cycles, initial denaturation at 94°C for 5 min, denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 52°C for 30 seconds, extension at 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 10 min. All PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and bands were visualized using Gel doc EZ imager (Biorad).

Immunofluorescence and confocal microscopy

MCF-7 cells were plated on coverslips in 24-well plates on coverslips at a density of 1 x 10⁵ cells/well. For transient transfection, the GFP-LC3 (green fluorescent protein-microtubule-associated protein light chain 3) plasmid was kindly provided by Dr. Elazar (Weizmann Institute, Israël) and ptf-LC3 was purchased from addgene (137624). Plasmids were transfected using the Jetprime reagent (Polyplus

transfection, 114-07) according to the manufacturer's protocol. After the designated treatments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4 % PFA (paraformaldehyde) in PBS for 15 min at room temperature and mounted with Vectashield Hardset (Vector laboratories, H1400). The cells were then examined and photographed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000). For ptf-LC3, green, red and yellow puncta were counted using "Green and Red puncta colocalization tool" on ImageJ.

For LysoTracker staining, following the designated treatments, cells were stained with 500 nM LysoTracker® Red DND-99 (Life technologies, L-7528) for 1h. Cells were then washed with PBS, fixed with 4 % PFA in PBS for 15 min at room temperature and mounted with Vectashield Hardset. The cells were then examined and photographed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000).

For GABARAPL1 and LAMP1, following the designated treatments, cells were washed with PBS and fixed with 4 % PFA in PBS for 15 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.2 % Triton-X100 in PBS for 5 min, washed with PBS, blocked with 5 % BSA (bovine serum albumin) in PBS for 45 min, incubated with anti-rabbit GABARAPL1 and anti-mouse primary antibodies overnight at 4°C and finally with goat anti-rabbit-FITC and Alexa Fluor 555 goat anti-mouse for 1 h. The cells were then mounted with Vectashield Hardset and analyzed using a confocal microscope. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random.

For immunofluorescence staining of tumor tissue, tumors were embedded in Tissue-Tek (Microm microtek, F/62550-1) and sliced using Cryostat (Microm microtech, HM560)(Plateau technique d'histopathologie, DImaCell platform). The slides were incubated at 95°C for 40 min in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, pH 6). The tissue sections were then incubated overnight with the previously described GABARAPL1 antibody and incubated for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibody at previously indicated dilutions. After each incubation, the slides were rinsed thrice in 1% PBS-Triton X-100. After being mounted in PBS-glycerol mounting medium, the slides were observed and analyzed using confocal microscopy.

Cell migration and invasion assays

10⁵ cells were diluted in 250 µl serum-free medium, added to the upper chamber

of the Boyden modified chamber™ (SPL Life Sciences) and incubated for 24 h at 37°C. For the cell invasion assay, 50 µl of extra cellular matrix (ECM) gel (Sigma-Aldrich, E1270, 1 mg/ml) were added to the upper chamber 5 hours before cell seeding. The invasive cells were fixed, stained with 2 % crystal violet and images from each membrane were taken. Finally, the invasive cells located in the lower chamber were counted manually.

Cell proliferation

Cells were plated in 96-well plates at a density of 1.5×10^3 cells/well and cell proliferation experiments were conducted over a 7-day period using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, M2128). Each day, 100 µl of 100 mM MTT solution in Hank's were added to the cells after the removal of the supernatant. After a 2 h incubation, the formazan crystals were dissolved in 50 µl of DMSO (dimethyl sulfoxide)(Euromedex, UD8050-A) and the absorbance was quantified at 549 nm using a microplate reader (Multiskan FC, ThermoScientific). For each clone, two independent experiments were performed in 24 wells.

Colony formation assay

Cells were plated in 6-well plates at a density of 2×10^3 cells/well. After 15 days, colonies were fixed with 100% ethanol for 10 min and stained with 2% crystal violet for 10 min. The excess dye was removed with water and colony formation was imaged using ChemiDoc XRS+ and Image Lab 2.0 software (Biorad). Quantitative changes in clonogenicity were determined by counting the colonies, using Bio-Rad Vision-Capt software.

Cell-matrix adhesion assay

Cells were plated in 24-well plates at a density of 4×10^5 cells/well in serum-free DMEM for 1 h and 3 h at 37°C (three wells/cell line: one well to control the number of seeded cells and the two others for the two different times after seeding). After washing, adherent cells were collected and pelleted down. Then, cells were counted with Malassez cell. Results were expressed as the ratio between plate adhering cells and total seeded cells.

Anchorage independent cell proliferation.

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well in 0.3% agar (Fisher Scientific, 10776644). Before seeding, 0.6% agar was added into each well. The cell layers were then covered with complete medium and cultured for 25 days at 37°C. Images from four representative fields of each well were taken and analyzed.

Wound healing assay

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well. After cell became confluent, two artificial wound per well were scratched into the monolayers with a micropipette tip. After wounding, tissue culture medium was removed, and cells were washed at least twice in PBS to eliminate detached cells. Wound closure was monitored at the moment of wounding and after 24 h, 48 h and 72 h. The area of wound was quantified using image J software. The migration of cells was expressed as the percentage of wound closure: % of wound closure = $[(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})/A_{t=0h}] \times 100\%$. $A_{t=0h}$ is the area of wound measured immediately after scratching, and $A_{t=\Delta h}$ is the area of wound measured 24 h, 48 h and 72 h after scratching.

Xenograft experiments

Rag γ/c mice were obtained from Taconic (Germantown, NY, USA) and maintained in the UMR1098 animal facility (agreement number #C25-056-7). Approval for animal experimentation and care was received from the "Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale" delivered by the "Ministère de l'Agriculture", Paris, France and experimental procedures were approved by a local ethic committee. One week prior to cell inoculation and until the end of the experiment, estrogen were administrated at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in drinking water. A total of 1.5×10^6 cells of different cell lines resuspended in 100 μL of PBS per mouse were inoculated subcutaneously in RAG γ/c mice ($n = 9$ per group) and tumor growth was monitored biweekly in each group. Tumor volume was calculated by the formula $V = \frac{1}{2} a \times b^2$, where a is the longest tumor axis and b is the shortest tumor axis. When tumors reached 1 cm in diameter, mice were sacrificed and each tumor was fixed in formol and photographed.

Proximity Ligation in situ Assay (P-LISA)

Cells were cultured for 24 h on coverslips and then fixed and permeabilized with cold methanol for 20 min at -20°C. P-LISA staining was performed according the

OlinkBioscience's recommendations using Duolink® In Situ Detection Reagents Red kit (Sigma-Aldrich, DUO92008) and as previously described.⁵¹

Transmission Electron microscopy

MCF-7 cells were washed in 0.1M Sørensen buffer, pH 7.3. Then, cells were fixed with 2% glutaraldehyde (Sigma Aldrich, G5882) in 0.1M Sørensen buffer, pH 7.3 for 1h at 4°C, and post-fixed in the mixture 1% osmium tetroxide (Sigma Aldrich, 75632) and 1.5% potassium ferricyanide (Sigma Aldrich, 702587) in 0.2M Sørensen buffer, pH 7.3 for 1h at 4°C. The cells cultures were dehydrated through a graded series of ethanol to 100%, embedded in Poly/Bed 812 resin (Polysciences, 21844-1) and polymerized for 48h at 60°C. Ultrathin sections were collected on 100 mesh nickel grids coated formvar-carbon (Delta microscopy), stained with uranyl acetate (Polysciences, 21447-25) and lead citrate. Then, they were imaged using a Technai 12 Biotwin TEM microscope (Primacem Platform, University of Rouen).

Flow cytometry

Cells were plated in 24-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C overnight. After designated treatments, cells were stained with MagicRed (Immunochemistry technologies according to the manufacturer's protocol) or 50 nM LysoTracker® Green DND-26 (Life technologies, L-7526) for 45 min. After two PBS washes, cells were then trypsinized and resuspended with 500 µl complete medium before being harvested at 5,000 g for 5 min and resuspended in 250 µl PBS. Cells (10,000 events) were then examined using a FC500 Beckman Coulter flow cytometer. Data were acquired and analyzed using the Flowing software.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using a Student's t test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgment

We thank Pierre-Yves Risold for his help and advices during immunofluorescence experiments and Christophe Houdayer for his technical help and advices during slicing of tumor tissue using the cryostat (Plateau technique

d'histopathologie, DImaCell, Besançon). Authors are grateful to Sophie Launay (Plateau technique Imagerie Cellulaire et Tissulaire, DImaCell, Besançon) and Valérie Perez for their technical help. We thank Dr. Elazar for kindly providing the pGFP-LC3 vector. Laura Poillet-Perez is supported by a fellowship from the "Région de Franche-Comté". This work was supported by the "Ligue contre le cancer" (Conférence de Coordination Inter Régionale Grand Est). We thank D.J. Shiwarski, R.K. Dagda, C.T. Chu for Green and Red puncta colocalization tool on ImageJ.

References

1. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:124-31.
2. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 2012; 22:R29-34.
3. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1102-9.
4. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 2014; 24:24-41.
5. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30:214-26.
6. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36:121-9.
7. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13:132-41.
8. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011; 331:456-61.
9. Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 2011; 7:643-4.
10. Pellerin I, Vuillermoz 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:R17-21.
11. 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.
12. 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.
13. Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, Dulieu P, Remy-Martin JP, Jouvenot M, Fraichard A. A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25.
14. 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.

15. 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.
16. Seguin-Py S, Lucchi G, Croizier S, Chakrama FZ, Despouy G, Le Grand JN, Ducoroy P, Boireau W, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, et al. Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein. *Biochimie* 2012; 94:748-58.
17. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2503-18.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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 GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* 2004; 279:36268-76.
23. Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:495-505.
24. 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.
25. Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bole-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, Chakrama FZ, Fraichard A, Darley-Usmar VM, Despouy G, et al. The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy* 2014; 10:986-1003.
26. Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Overvatn A, Kirkin V, Johansen T. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem* 2012; 287:39275-90.

27. Kraft C, Kijanska M, Kalie E, Siergiejuk E, Lee SS, Semplicio G, Stoffel I, Brezovich A, Verma M, Hansmann I, et al. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J* 2012; 31:3691-703.
28. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* 2011; 80:125-56.
29. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282:24131-45.
30. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 2009; 33:505-16.
31. Rozenknop A, Rogov VV, Rogova NY, Lohr F, Guntert P, Dikic I, Dotsch V. Characterization of the interaction of GABARAPL-1 with the LIR motif of NBR1. *J Mol Biol* 2011; 410:477-87.
32. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 2010; 11:45-51.
33. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem* 2010; 285:5941-53.
34. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368:651-62.
35. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5308-16.
36. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:1524-32.
37. Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol* 2014; 4C:184-92.
38. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21:1367-81.
39. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; 21:1621-35.
40. Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, Petersen I. Characterization of γ -aminobutyric acid type A receptor-associated protein,

a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:394-400.

41. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene* 2012; 31:4397-408.

42. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402:672-6.

43. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 2006; 8:688-99.

44. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* 2009; 217:702-6.

45. Brahim-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21:67-72.

46. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:38-47.

47. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafrasse C, Tolle F, Fraichard A, 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.

48. 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.

49. Liu C, Xia Y, Jiang W, Liu Y, Yu L. Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2014; 31:2043-8.

50. Zhang Y, Wang F, Han L, Wu Y, Li S, Yang X, Wang Y, Ren F, Zhai Y, Wang D, et al. GABARAPL1 negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell Physiol Biochem* 2011; 27:503-12.

51. Gauthier T, Claude-Taupin A, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Hervouet E. Proximity Ligation In situ Assay is a Powerful Tool to Monitor Specific ATG Protein Interactions following Autophagy Induction. *PLoS One* 2015; 10:e0128701.

52. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 2007; 3:452-60.

53. Zhou J, Tan SH, Nicolas V, Bauvy C, Yang ND, Zhang J, Xue Y, Codogno P, Shen HM. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Res* 2013; 23:508-23.

54. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.
55. Alam J, Deharo D, Redding KM, Re RN, Cook JL. C-terminal processing of GABARAP is not required for trafficking of the angiotensin II type 1A receptor. *Regul Pept* 2010; 159:78-86.
56. 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.
57. Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY. Effects of C-terminal modifications of GEC1 protein and gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor-associated protein (GABARAP), two microtubule-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* 2011; 286:15106-15.
58. Lim J, Kim HW, Youdim MB, Rhyu IJ, Choe KM, Oh YJ. Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy* 2011; 7:51-60.
59. Gao W, Kang JH, Liao Y, Ding WX, Gambotto AA, Watkins SC, Liu YJ, Stolz DB, Yin XM. Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *J Biol Chem* 2010; 285:1371-83.
60. Tung YT, Hsu WM, Lee H, Huang WP, Liao YF. The evolutionarily conserved interaction between LC3 and p62 selectively mediates autophagy-dependent degradation of mutant huntingtin. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30:795-806.
61. Dunlop EA, Hunt DK, Acosta-Jaquez HA, Fingar DC, Tee AR. ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy* 2011; 7:737-47.
62. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; 115:577-90.
63. Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy* 2013; 9:1407-17.
64. McEwan DG, Dikic I. PLEKHM1: Adapting to life at the lysosome. *Autophagy* 2015:0.
65. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, Coxon FP, Miranda de Stegmann D, Bhogaraju S, Maddi K, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell* 2015; 57:39-54.
66. Wang H, Sun HQ, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, Yin H. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:7015-20.

67. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Pous C. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci* 2013; 126:1071-80.
68. Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem* 2006; 281:36303-16.
69. Tuloup-Minguez V, Hamai A, Greffard A, Nicolas V, Codogno P, Botti J. Autophagy modulates cell migration and beta1 integrin membrane recycling. *Cell Cycle* 2013; 12:3317-28.
70. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149:274-93.
71. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23:53-62.
72. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006; 25:6416-22.
73. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59:59-65.
74. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112:1809-20.
75. Elgendy M, Ciro M, Abdel-Aziz AK, Belmonte G, Dal Zuffo R, Mercurio C, Miracco C, Lanfrancone L, Foiani M, Minucci S. Beclin 1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner. *Nat Commun* 2014; 5:5637.
76. Cicchini M, Chakrabarti R, Kongara S, Price S, Nahar R, Lozy F, Zhong H, Vazquez A, Kang Y, Karantza V. Autophagy regulator BECN1 suppresses mammary tumorigenesis driven by WNT1 activation and following parity. *Autophagy* 2014; 10:2036-52.
77. Haan C, Behrmann I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 2007; 318:11-9.
78. Morel C, Adami P, Musard JF, Duval D, Radom J, Jouvenot M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2007; 313:3971-82.

Figure legends

Fig. 1: Characterization of MCF-7 overexpressing GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A. (A) Alignment of the amino acid sequences of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A (Top). Schema representing the cleavage and lipidation of GABARAPL1 during autophagy (Bottom). (B) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were lysed and total proteins (30 μ g) were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-GABARAPL1 and anti-ACTIN antibodies. A representative image of three independent experiments is shown. (C) After a reverse transcription step, relative GABARAPL1 mRNA expression was determined by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control. A representative image of two independent experiments is shown. (D) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium with or without 50 mM NH_4Cl for 2h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μ l were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-GABARAPL1 and anti-ACTIN antibodies. A representative image of three independent experiments is shown. (E) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium or EBSS with or without 100 nM BafA1 for 8 h. Cells were then immunostained for GABARAPL1. A representative image of two independent experiments is shown. Scale bar represents 10 μ m. (F) MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A c1 cells were cultured in complete medium. Cells were then fixed with methanol and assayed with P-LISA. P-LISA signals for TUBULIN/GABARAPL1 interaction are visualized in red and nuclei are stained with DAPI (blue). A representative image of three independent experiments is shown. The number of red dots and the intensity per dots were counted using the Blobfinder software. 200 cells were randomly selected in 5 fields. Data are means \pm S.E.M. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 5 μ m. (G) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium with or without 2 μ M MG132 for 16h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μ l were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-GABARAPL1 and anti-ACTIN antibodies. Expression of exogenous GABARAPL1 (Flag:GABARAPL1:6His or Flag:GABARAPL1-G116A:6His : 19 kDa) and endogenous GABARAPL1 (16 kDa) were studied.

Fig. 2: The G116A mutation impaired the effect of GABARAPL1 on induced but not basal autophagy. **(A)** Electron microscopy of MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. Av: Autophagic vesicles; Lys: Lysosomes and M: Mitochondria. Scale bar represents 0.25 μm . Representative image of 60 pictures for each cell lines is shown. **(B)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium with or without 100 nM BafA1 or 40 μM Chloroquine (CQ) for 2h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μl were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-LC3 and anti-ACTIN antibodies. Representative image of ten independent experiments is shown. LC3-II levels were quantified using the Image Lab software. Data are means \pm S.E.M. of ten independent experiments. *P <0.05 compared to the associated control **(C)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in EBSS for 4h with or without 100 nM BafA1 for 2h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μl were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-LC3 and anti-ACTIN antibodies. Representative image of ten independent experiments is shown. LC3-II levels were quantified using the Image Lab software. Data are means \pm S.E.M. of ten independent experiments. *P <0.05 compared to the associated control **(D)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 c1 and c2 cells were transfected with the ptf-LC3 vector. 24h after transfection, cells were cultured in complete medium or EBSS. GFP-RFP-LC3 puncta were then analyzed by confocal microscopy. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 20 fields chosen at random. Red and yellow puncta were counted using the ImageJ software (Green and Red puncta colocalization tool). For each experiment, 20 cells were randomly selected. Data are means \pm S.E.M. of two independent experiments. *P <0.05, yellow and red punctuations compared to the respective yellow or red punctuations of control cells. Scale bar represents 10 μm . **(E)** MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A c1 cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h with 100 nM BafA1 for 2h. Cells were then fixed with methanol and assayed with P-LISA. P-LISA signals for SQSTM1/GABARAPL1 interaction are visualized in red and nuclei are stained with DAPI (blue). A representative image of three independent experiments is shown. The number of red dots and the intensity per dots were counted using the Blobfinder software. 200 cells were randomly selected in 5 fields. Data are means \pm S.E.M. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 5 μm .

Fig. 3: The G116A mutation impaired GABARAPL1 functions during late stages of autophagy. (A, B) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h and with 500 nM LysoTracker red for the last 1 h. (A) LysoTracker-stained acidic vesicles were quantified using a confocal microscope and the Blobfinder software. For each group, 50 cells were randomly selected. The data representative of three independent experiments are shown. Data are means \pm S.E.M. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 10 μ m. (B) Intensity of LysoTracker fluorescence was analyzed by flow cytometry using the flowing software. Data are means \pm S.E.M. of four independent experiments performed in duplicate. *P <0.05 compared to the control. (C) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were lysed in SB1X and 30 μ l were separated on a 12,5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-LAMP1 and anti-ACTIN antibodies. Data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown (D) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium and were then immunostained for LAMP1. A representative image of three independent experiments is shown. Scale bar represents 10 μ m. (E) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h and with MagicRed for the last 45 min. Intensity of MagicRed fluorescence was analyzed by flow cytometry using the flowing software. The quantification data (left) and the typical histograms were shown (F) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector. 24h after transfection, cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h and were then immunostained for LAMP1. Colocalization of the autophagosome marker GFP-LC3 and the lysosomal marker LAMP1 was analyzed using a confocal microscope and the Pearson's coefficient using coloc_2 (ImageJ software). For each group, 25 cells were randomly selected. The data representative of two independent experiments are shown. Data are means \pm S.E.M. *P <0.05 compared to the control.

Fig. 4: The G116A mutation did not impair GABARAPL1 functions during early stages of autophagy. (A, B and C) MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μ l were separated on a 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-MTOR and anti-P-MTOR antibodies (A), anti-P70S6 and anti-P-P70S6 antibodies (B) or anti-P-ULK1 and anti-ACTIN antibodies (C). Protein levels were

quantified using the Image Lab software. Representative image of four independent experiments is shown. Data are means \pm S.E.M. of four independent experiments. *P <0.05 compared to the control.

Fig. 5: The G116A mutation modified the effect of GABARAPL1 on some cancer cell phenotypes *in vitro*. **(A)** Growth rate of MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells using MTT assay. The data representative of three independent experiments performed in 24 replicates are shown. Data are means \pm S.D. *P <0.05 compared to the control **(B)** Clonogenic assay for MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. 2000 cells were plated in a 6-well plate and 15 days later, cells were fixed and stained with 2% crystal violet. The colony numbers were evaluated by counting using Vision Capt software. The data representative of two independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.D. *P <0.05 compared to the control **(C)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were plated in 24-well plate in serum-free medium for 1 and 3h. Adherent cells were then collected and counted. The data representative of two independent experiments performed in triplicate are shown. Data are means \pm S.D. *P <0.05 compared to the control. **(D)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were used for the soft agar colony formation assay. Representative cell colonies in soft agar are shown. Data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.D. *P <0.05 compared to the control. **(E)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were seeded on polycarbonate filters coated with Matrigel and incubated for 24h. Inserts were then stained with a 2% crystal violet solution and photographed to study cell invasion. A representative image of ten fields of view (FOV) of each membrane is shown. 10 FOV were randomly selected and the number of invasive cells was determined. Data representative of two independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.D. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 10 μ m. **(F)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were seeded on polycarbonate filters and incubated for 24h. Inserts were then stained with a 2% crystal violet solution and photographed to study cell migration. A representative image of ten fields of view (FOV) of each membrane is shown. 10 FOV were randomly selected and the number of migrative cells was determined. Data representative of two independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.D. *P <0.05

compared to the control. Scale bar represents 10 μm . **(G)** MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were plated in 6-well plate and wound was performed after confluence. Migration was assessed after 24 and 48h. Data representative of two independent experiments performed in 8 replicates are shown. The wound area was quantified using imageJ software. Data are means \pm S.D. *P <0.05 compared to the control.

Fig. 6: The G116A mutation did not modify the effect of GABARAPL1 on tumor growth *in vivo*. MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells were injected subcutaneously in Rag γ /c mice (n = 12 per group). One week prior to cell inoculation and until the end of the experiment, estrogen were administrated at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in drinking water. **(A)** 13 days after injection, the evolution of the tumor volume was measured twice a week. The tumor volume was calculated using the formula: $V = \frac{1}{2} a \times b^2$, where a is the longest tumor axis, and b is the shortest tumor axis. 42 days after injection, tumors were fixed in formol and photographed. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * P <0.05, compared to the control. **(B)** Tissue sections of tumors fixed in formol were subjected to GABARAPL1 immunostaining. Sections were then analyzed by confocal microscopy and a representative image of 2 independent experiments is shown. Scale bar represents 10 μm .

Fig. 7: GABARAPL1 functions in autophagy and cancer. Our results demonstrated that GABARAPL1, which is linked to the autophagosome, enhances basal and induced autophagy. GABARAPL1 also increases early stages of autophagy through regulation of MTOR or ULK1 activity and late stages of this process through regulation of lysosome activity and autophagosome/lysosome fusion. GABARAPL1 G116A, which is not linked to the autophagosome, can only enhance basal autophagy through regulation of the early stages of this process. However, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A both inhibit tumor growth *in vivo* suggesting that GABARAPL1 conjugation to autophagosomes as well as its functions during late stages of autophagy is not required for its tumor suppressive functions.

Fig. 1

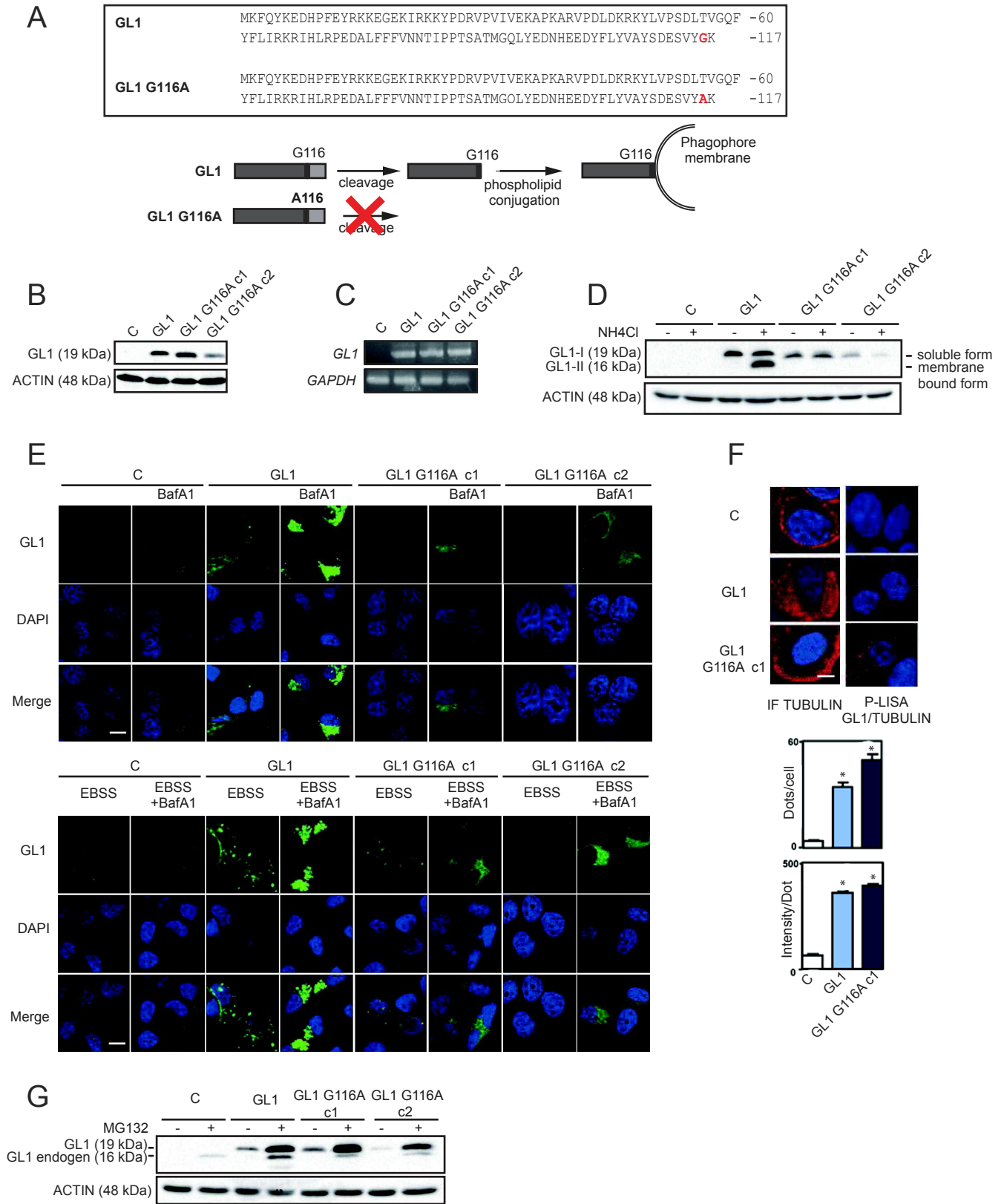
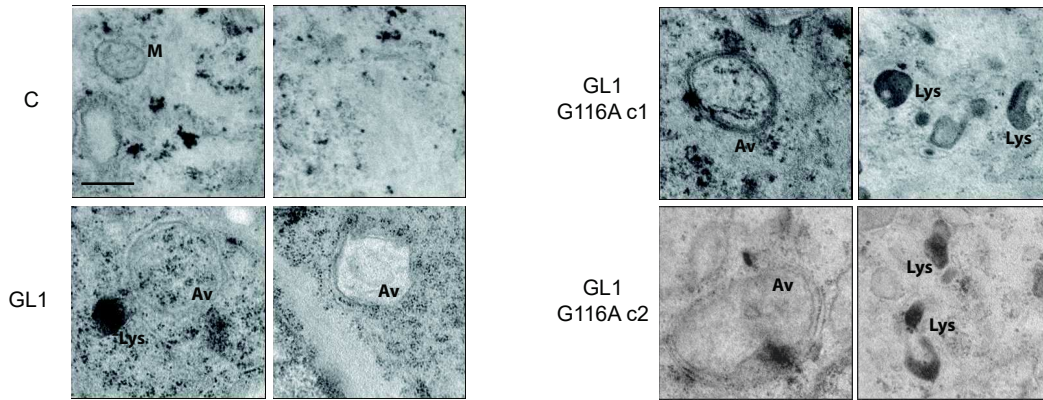
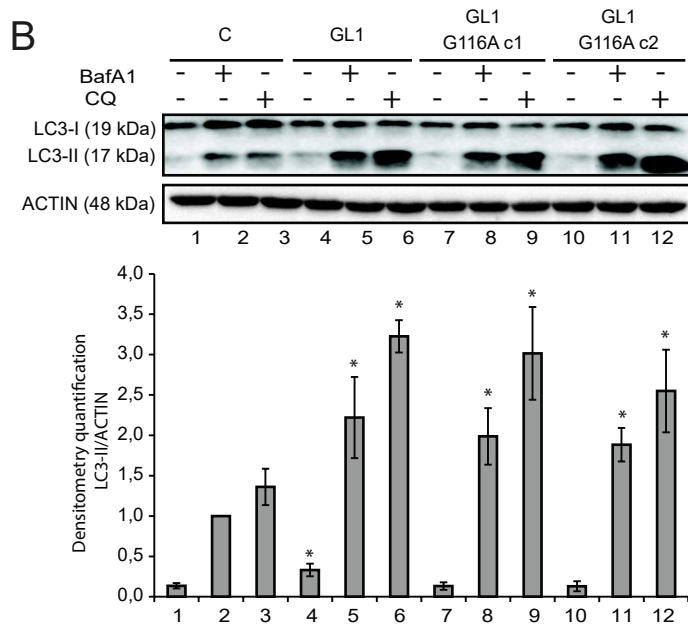


Fig. 2

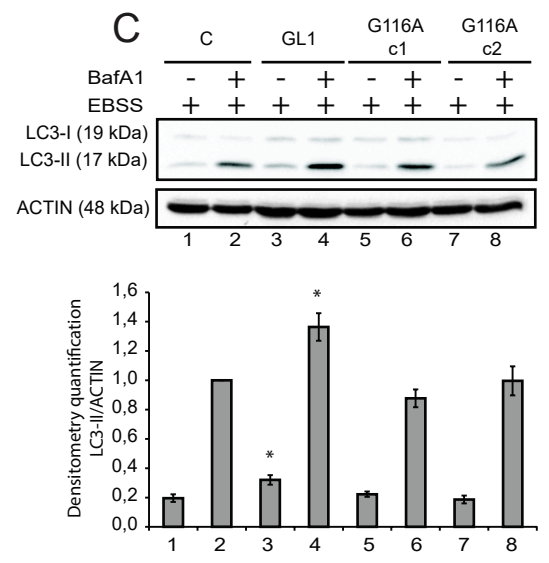
A



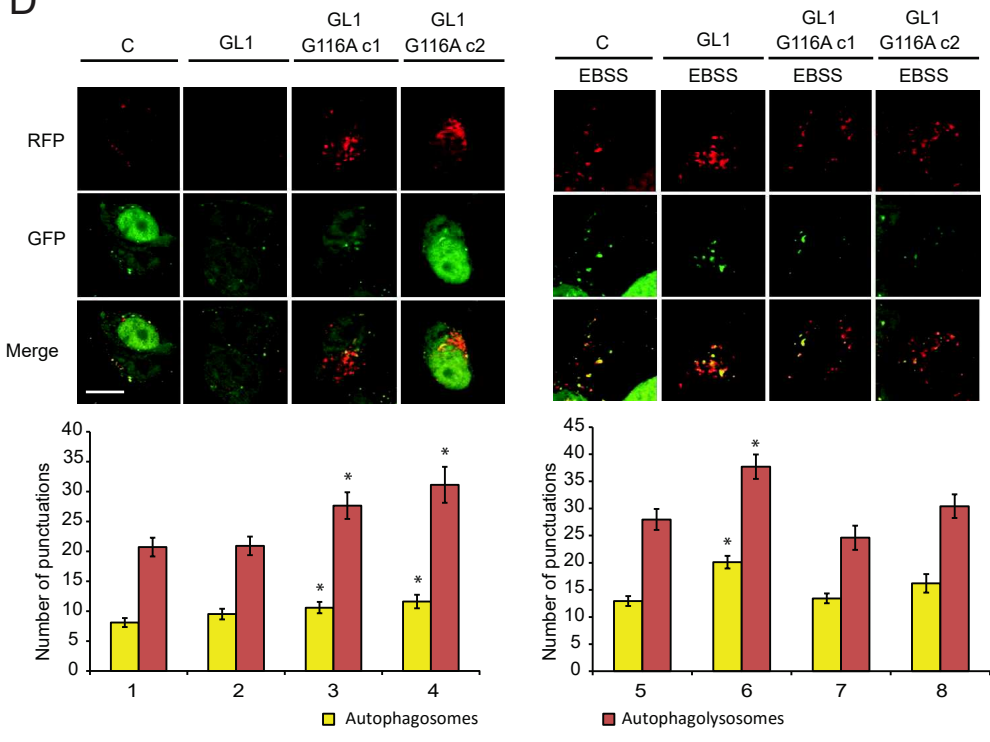
B



C



D



E

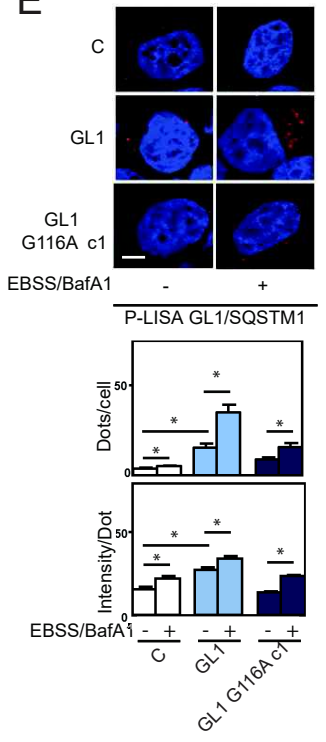


Fig. 3

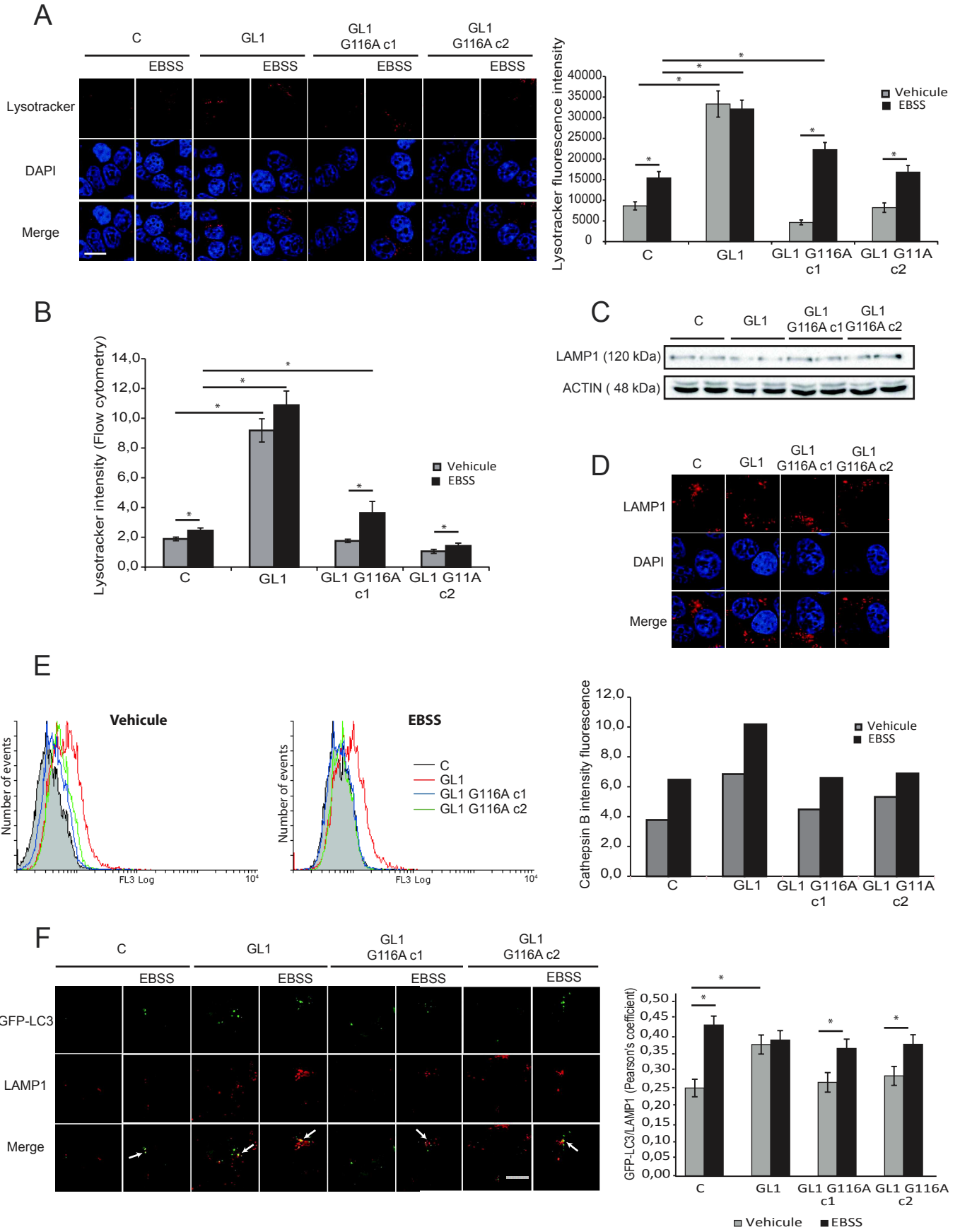
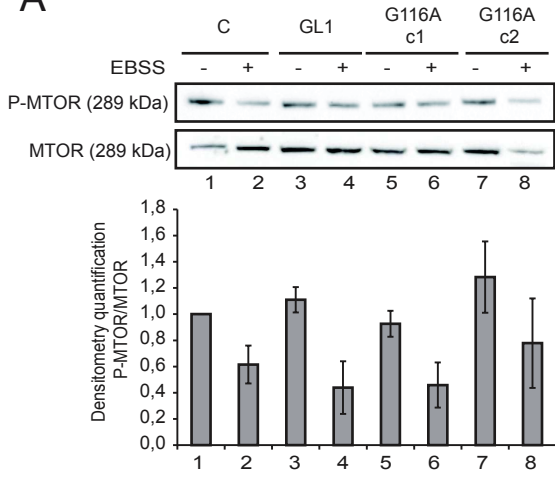
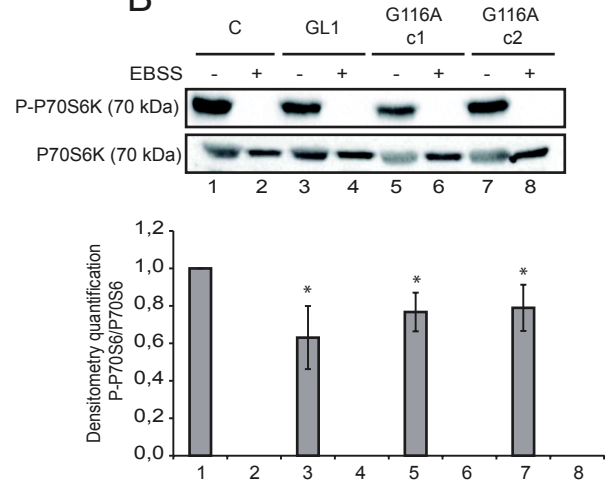


Fig. 4

A



B



C

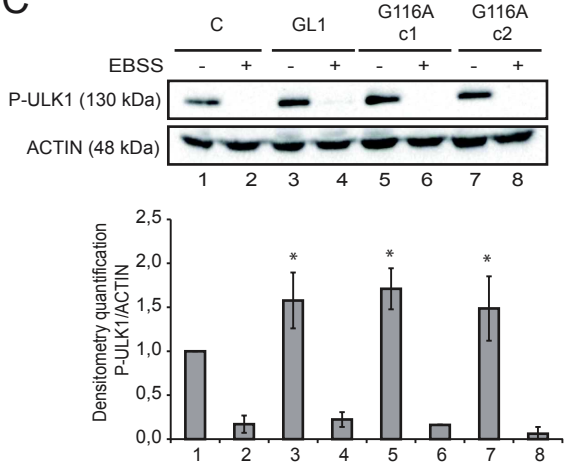


Fig. 5

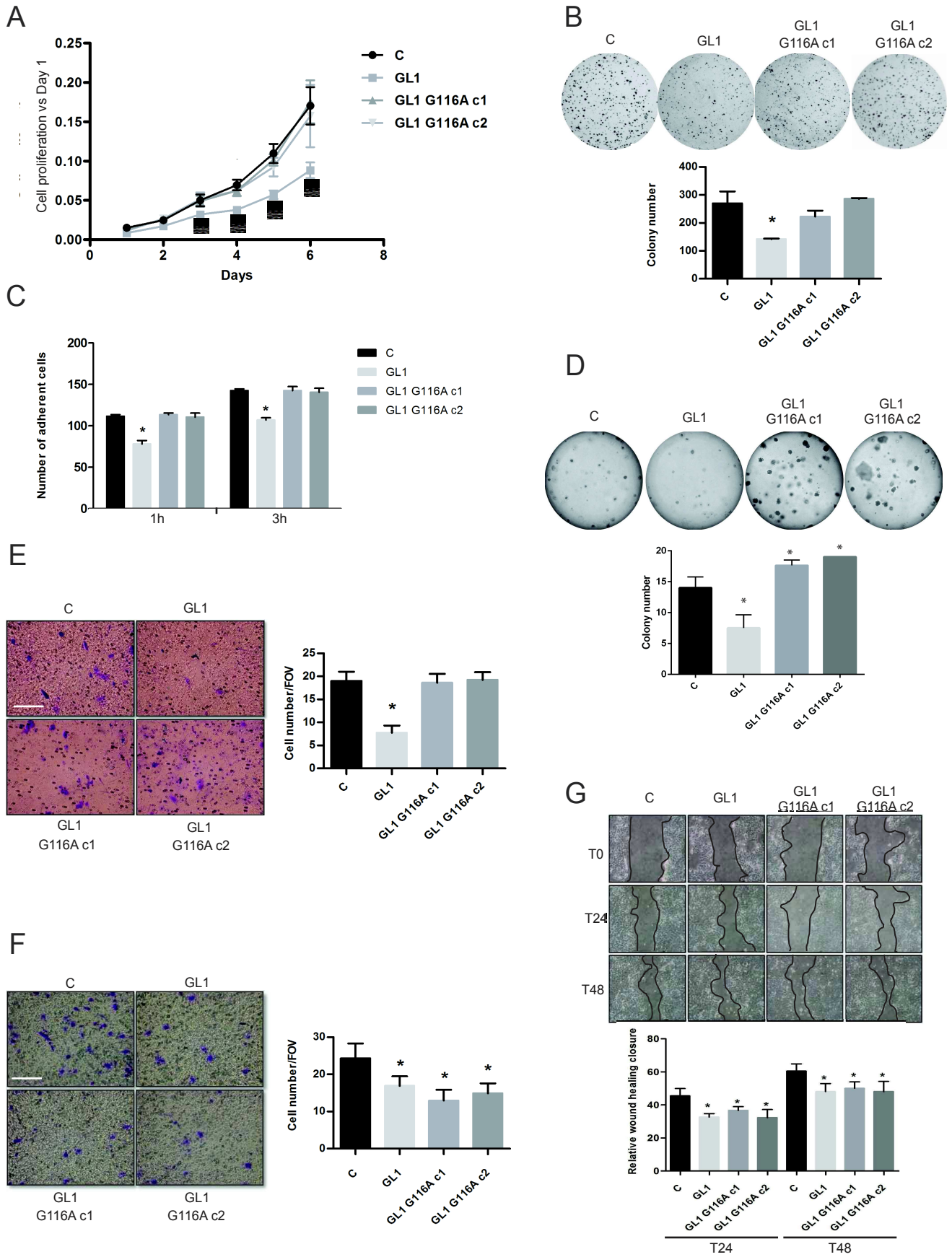
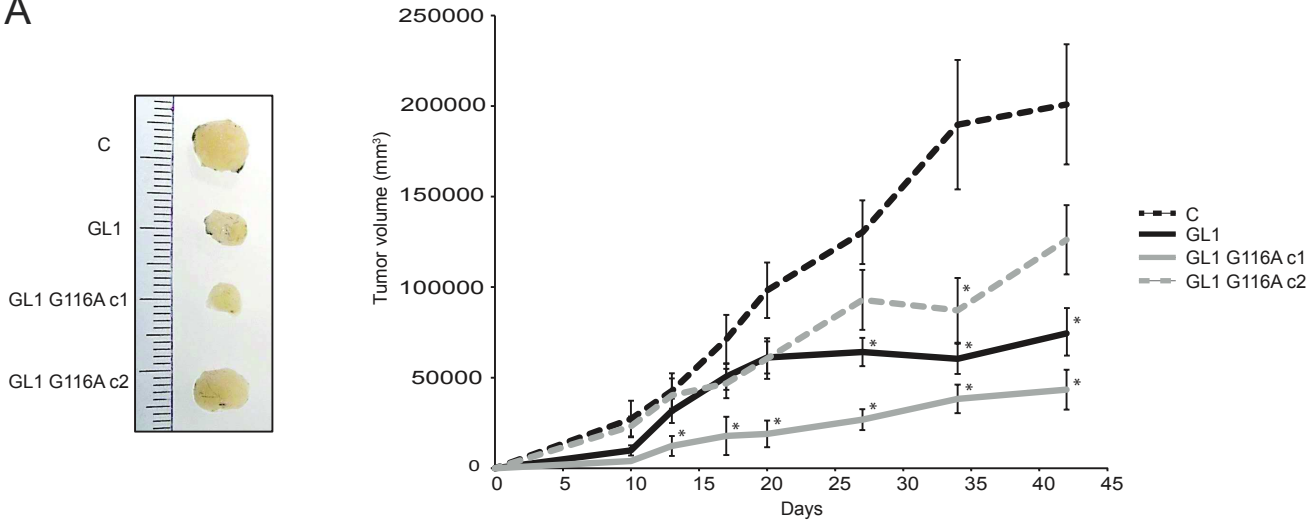


Fig. 6

A



B

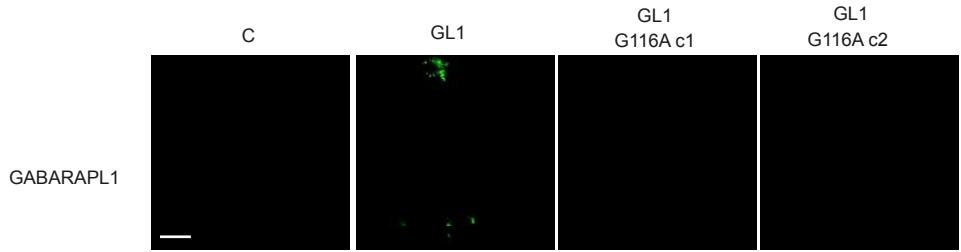
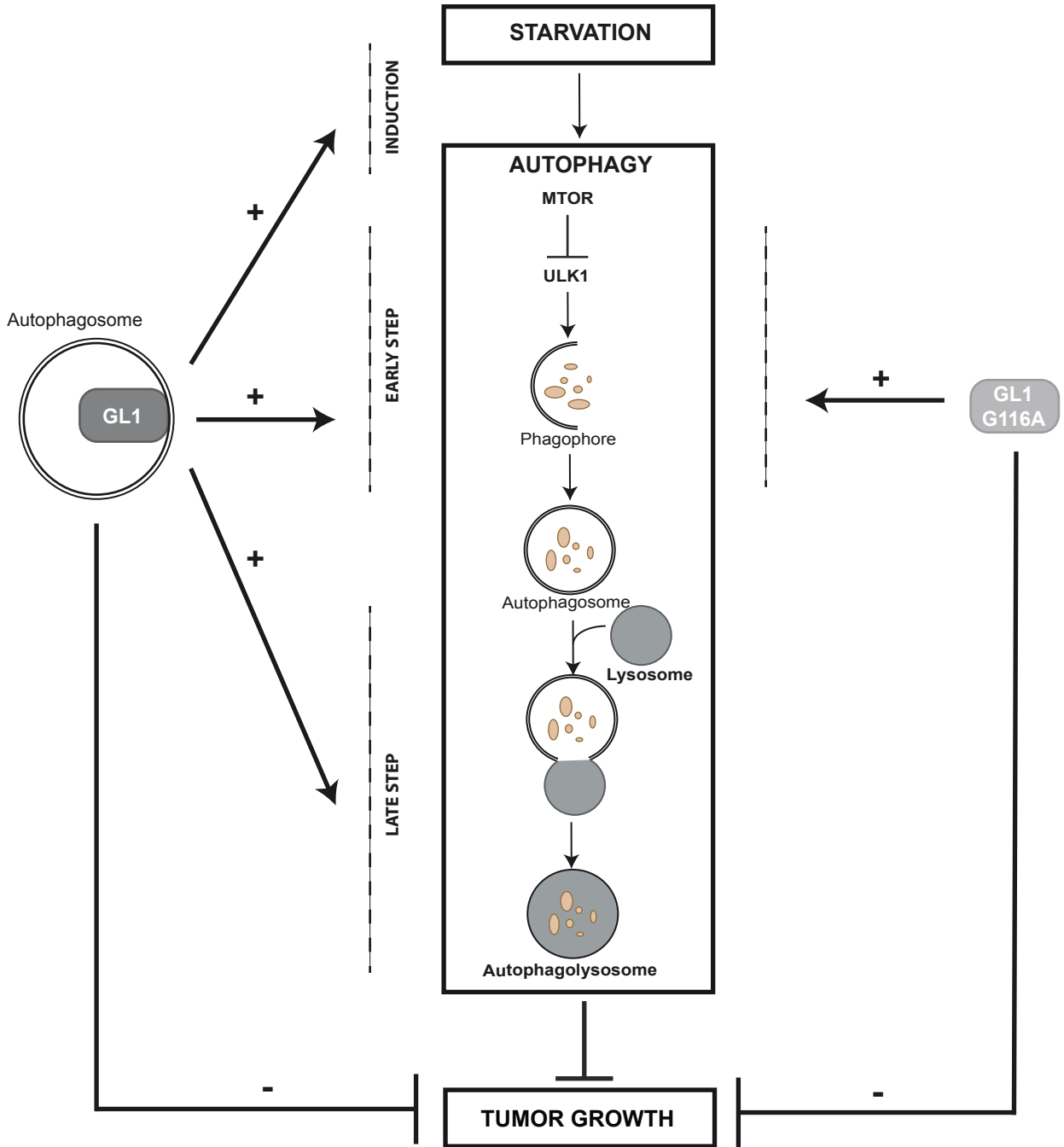


Fig. 7



Au cours de ma thèse, j'ai également pu étudier le rôle des membres de la famille GABARAP dans la transformation cellulaire et débiter l'étude du protéome global des cellules MCF-7 surexprimant GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A. Ces travaux ont abouti à l'obtention de résultats complémentaires présentés dans la suite de ce manuscrit. Un article est actuellement en préparation avec les résultats obtenus pour le rôle des membres de la famille GABARAP dans la transformation cellulaire.

III. ROLE DES MEMBRES DE LA FAMILLE GABARAP DANS LA TRANSFORMATION CELLULAIRE PAR H-RASG12V

Plusieurs acteurs sont responsables de la tumorigenèse (transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse) et en particulier les oncogènes de la famille RAS présents sous plusieurs isoformes N, K et H (Jiang *et al.*, 2009). Un lien étroit entre autophagie et transformation par RAS a été mis en évidence. Lors des étapes précoces de la transformation cellulaire, l'autophagie a un rôle anti-tumoral en favorisant la mort cellulaire et la sénescence induite par les oncogènes HRAS et BRAF (Elgandy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013b; Young *et al.*, 2009). Au contraire, lors des étapes plus tardives de la tumorigenèse, l'autophagie a un rôle pro-tumoral. En effet, les oncogènes HRAS, KRAS et BRAF induisent l'autophagie afin de subvenir aux besoins métaboliques des cellules cancéreuses les rendant ainsi dépendantes à ce processus (Guo *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011c; Lock *et al.*, 2011; Strohecker *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011).

Comme abordé précédemment, le rôle de GABARAP et GABARAPL1 sur les phénotypes cancéreux *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* a été mis en évidence dans de nombreux cancers. Néanmoins, aucune étude sur le rôle de ces protéines dans la tumorigenèse n'a été réalisée jusqu'à présent. **L'objectif de ce travail a donc été d'étudier le rôle des membres de la famille GABARAP dans la tumorigenèse en utilisant des lignées de fibroblaste embryonnaire de souris : MEF.** En effet, chez la souris, deux événements moléculaires sont nécessaires et suffisants pour transformer une cellule normale en cellule cancéreuse contrairement à l'homme qui en nécessite entre trois et sept. Ces deux événements sont : i) l'immortalisation et ii) la transformation cellulaire par un oncogène. Dans notre cas, les cellules MEF ont été immortalisées par l'antigène T du virus SV40 et transformées par l'oncogène HRAS^{G12V} (protéine HRAS mutée présentant sa glycine en position 12 remplacée par une

valine). Différentes lignées cellulaires étaient déjà disponibles au laboratoire : MEF primaires (MEFp) et MEF immortalisées (MEFi).

Nous avons tout d'abord étudié l'expression de GABARAPL1 et GABARAP dans ces différentes lignées (**Figure 18**). Le cerveau de rat constitue un témoin positif de GABARAPL1 puisque cette protéine y est majoritairement exprimée comparativement à GABARAP. L'expression de ces protéines a été analysée par western-blotting à l'aide de l'anticorps commercialisé par « Chemicon » reconnaissant à la fois GABARAPL1 et GABARAP (Le Grand *et al.*, 2011b). Les résultats montrent que GABARAPL1 est faiblement exprimée dans les cellules MEFp et MEFi par rapport à GABARAP.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser deux modèles cellulaires MEF distincts : un modèle d'inactivation de *GABARAP* (déjà disponible au sein de notre laboratoire) et un modèle de surexpression de GABARAPL1. À partir de ces modèles cellulaires, nous avons : 1) étudié l'effet de l'inactivation de *GABARAP* sur la transformation cellulaire, 2) mis en place des modèles cellulaires surexprimant GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A et 3) étudié l'expression endogène des protéines ATG8 au cours de l'immortalisation et de la transformation.

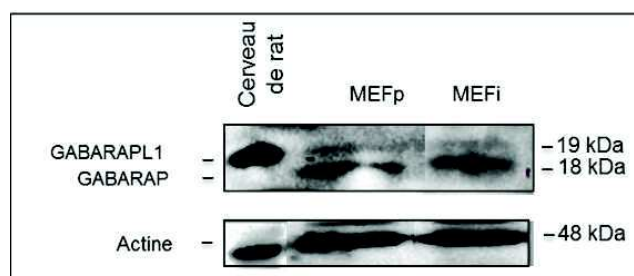


Figure 18 : Analyse de l'expression des protéines GABARAP et GABARAPL1 dans les lignées MEFp et MEFi. 50 µg de protéines ont été séparés sur gel SDS-PAGE 12,5%. La révélation a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines GABARAP, GABARAPL1 (Chemicon) et actine.

1. Effet de l'inactivation de GABARAP au cours de la transformation

1.1. Caractérisation du modèle d'inactivation de GABARAP (MEFi GABARAP^{-/-})

Des études antérieures ont mis en évidence que l'inactivation des gènes *ATG5* ou *ATG7* perturbe la transformation des cellules MEF par l'oncogène HRAS^{G12V} (Lock *et al.*, 2011). Nous avons donc voulu étudier l'effet de l'inactivation de *gabarap* au cours de la transformation. Tout d'abord, nous avons validé la lignée cellulaire MEFi GABARAP^{-/-} disponible au sein de notre laboratoire en étudiant l'expression des protéines SV40 et GABARAP (**Figure 19**). L'antigène T de SV40 est exprimé très fortement dans les cellules MEFi WT et MEFi GABARAP^{-/-} tandis que la protéine GABARAP est exprimée uniquement dans les cellules MEFi WT mais pas détectée dans les cellules MEFi GABARAP^{-/-} confirmant

l'invalidation de *GABARAP* dans cette lignée.

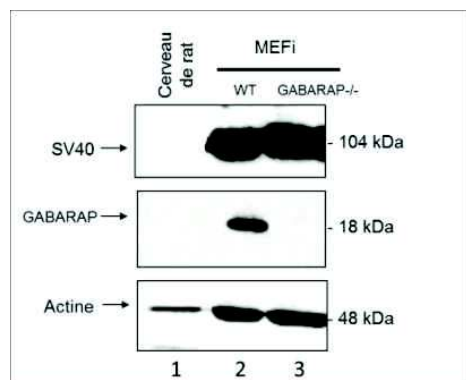


Figure 19 : Validation des modèles cellulaires MEFi WT et MEFi GABARAP^{-/-}. 60 µg de protéines ont été séparés sur gel SDS-PAGE 12,5%. La révélation a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines SV40, GABARAP et actine.

1.2. Obtention et caractérisation des lignées stables MEFt WT et MEFt GABARAP^{-/-}

/-

Afin d'étudier le rôle de GABARAP dans la transformation cellulaire, des cellules MEFi WT et MEFi GABARAP^{-/-} ont été transfectées de manière stable par les plasmides pBABE vide (contrôle) et pBABE-HRAS^{G12V}. Ce dernier conduit à l'obtention de cellules MEF surexprimant HRAS^{G12V} appelées MEFt WT et MEFt GABARAP^{-/-} qui permettront l'étude de la transformation cellulaire induite par cet oncogène.

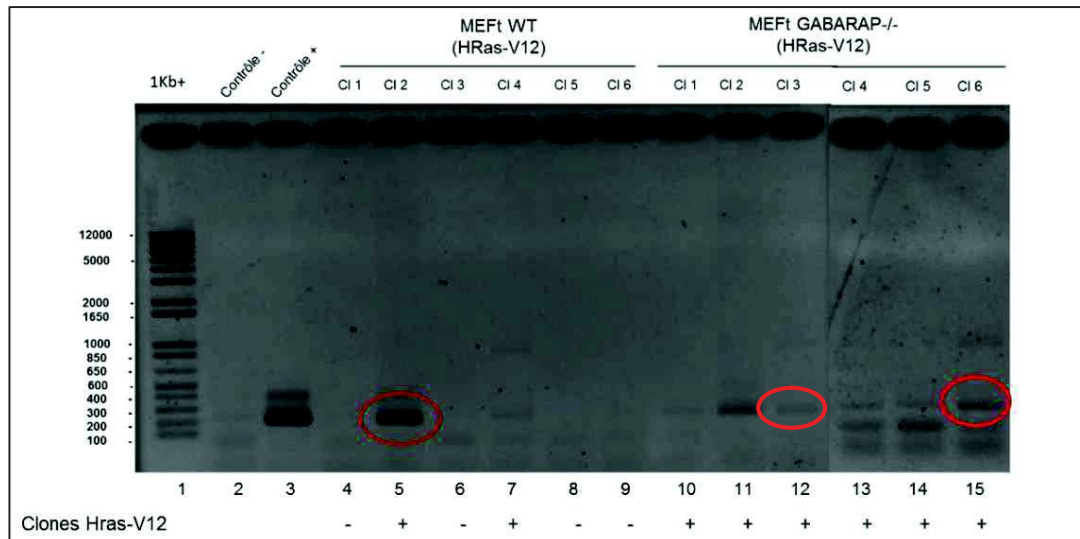


Figure 20 : Analyse génomique des clones stables isolés provenant de la transfection stable par pBABE-HRAS^{G12V} des lignées MEFi WT et GABARAP^{-/-}. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR obtenus à l'aide des amorces HRAS^{G12V} sens et pBABE3 rev à partir d'ADN génomique (pistes 4-16). Piste 1, 1 Kb+ ladder (Invitrogen). Piste 2, contrôle négatif (H₂O). Piste 3, contrôle positif (1 ng du plasmide pBABE- HRAS^{G12V}).

Les clones obtenus ont d'abord été validés au niveau de l'ADN génomique. La présence du gène *HRAS^{G12V}* a été étudiée par PCR en utilisant une amorce sens interne au gène *HRAS^{G12V}* et une amorce anti-sens située dans le vecteur pBABE. Ces amorces permettent de détecter uniquement le gène *HRAS^{G12V}* et non le gène *HRAS* endogène de souris. Les produits de PCR

ont ensuite été analysés par électrophorèse en gel d'agarose (**Figure 20**). Une bande de taille attendue (200 pb) a été obtenue pour les clones 2 et 4 de la lignée MEFt WT (piste 5 et 7) et pour les clones 1 à 6 de la lignée MEFt GABARAP^{-/-} (piste 10 à 15). Le clone 2 MEFt WT et les clones 3 et 6 MEFt GABARAP^{-/-} ont été retenus pour la suite des expériences.

L'expression de HRAS^{G12V} a ensuite été analysée au niveau protéique dans nos lignées MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-} cl6 (**Figure 21**). L'anticorps utilisé ne permet pas de discriminer la forme endogène HRAS murine de la forme exogène HRAS^{G12V} mutée humaine. Le signal observé à 21 kDa correspond donc au cumul des deux formes. La protéine HRAS est plus fortement exprimée dans les cellules MEFt WT et GABARAP^{-/-} cl6 comparativement aux cellules MEFi WT et GABARAP^{-/-} démontrant l'expression protéique de HRAS^{G12V} dans les lignées MEFt.

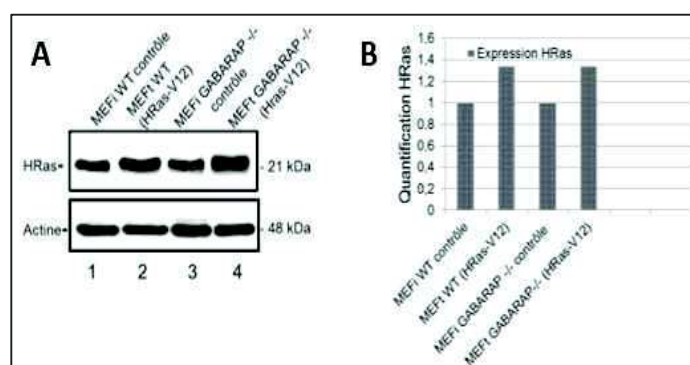


Figure 21 : Analyse de l'expression de la protéine HRAS^{G12V} dans les lignées MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-} cl6. (A) 50 µg de protéines ont été séparés sur gel SDS-PAGE 12,5%. La révélation a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines HRAS et actine. Cette image est représentative de 3 western-blots réalisés à partir de 3 extractions de protéines différentes. (B) Quantification du taux de protéines HRAS. L'actine a été utilisée comme témoin de normalisation.

D'un point de vue morphologique, la lignée MEFi WT est fusiforme alors que la lignée MEFi GABARAP^{-/-} présente une forme plus allongée avec de longs prolongements cellulaires. Après transformation par HRAS^{G12V}, les lignées MEFt WT et GABARAP^{-/-} cl3 et cl6 présentent une morphologie plus étoilée (**Figure 22**).

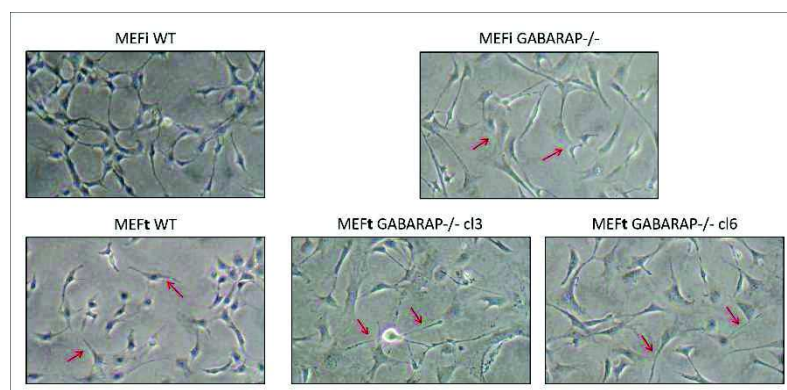


Figure 22 : Observation morphologique des lignées MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-}. Photographies au microscope à contraste de phase X100 des différentes lignées cellulaires étudiées.

Afin d'étudier l'effet de l'inactivation de *GABARAP* dans les lignées MEFt au cours de la transformation par HRAS^{G12V}, les principaux phénotypes tumoraux ont été étudiés dans nos lignées MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-} (**Figure 23 et Figure 24**). Nous avons d'abord étudié la prolifération de nos différentes lignées cellulaires MEFi WT et GABARAP^{-/-} et MEFt WT et GABARAP^{-/-} c13 et c16 par test MTT (**Figure 23A**). Comme attendu, la lignée MEFt WT prolifère beaucoup plus vite que la lignée MEFi WT. Lorsque *GABARAP* est invalidé, l'effet de la transformation par HRAS^{G12V} est diminué.

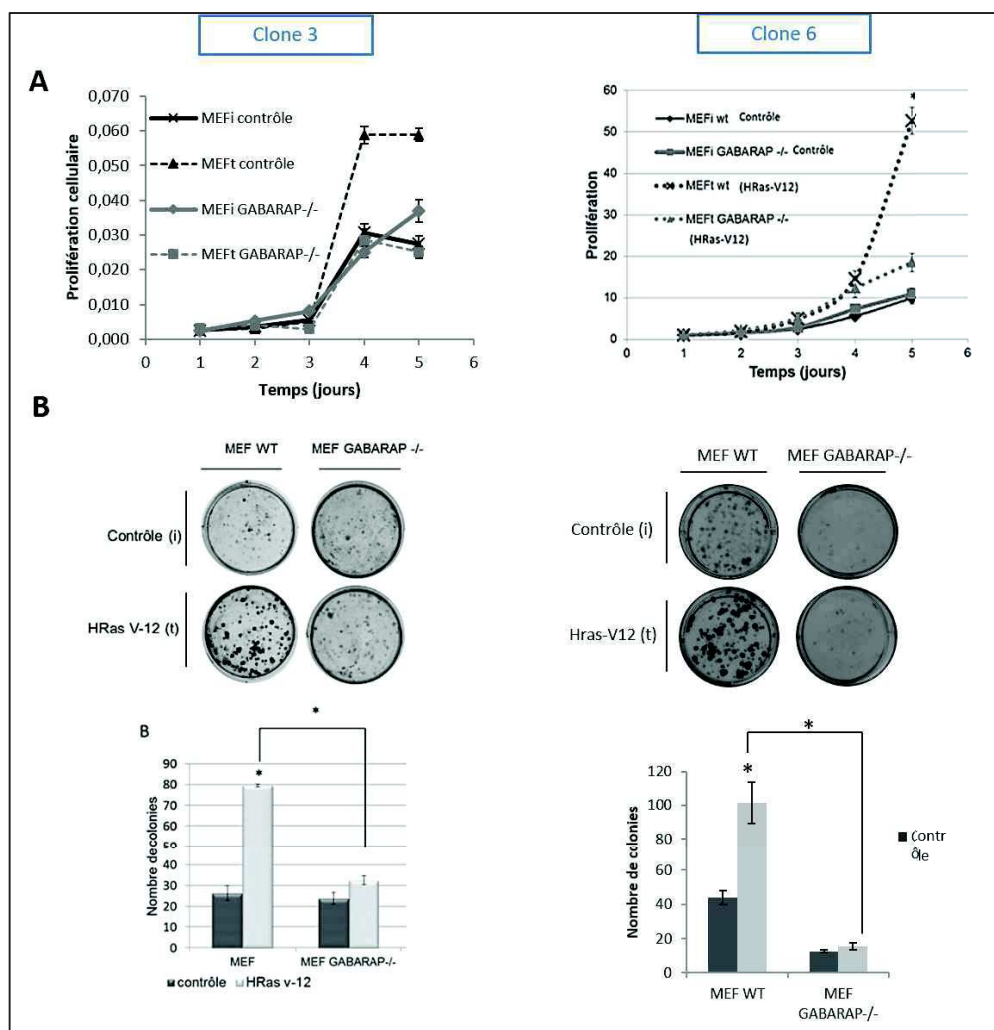


Figure 23 : Prolifération et clonogénéité des cellules MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-} c13 et c16. (A) Les cellules MEFi et MEFt ont été ensemencées en plaques 96 puits à raison de 300 cellules par puit. Chaque jour la plaque a été soumise au test MTT. Les résultats correspondent à la moyenne de 16 puits par expérience pour chaque lignée. Les données indiquent la moyenne \pm SD * : $p < 0,05$, significativité par rapport à la lignée MEFt GABARAP^{-/-}. (B) Etude de la capacité des cellules à former des nouvelles colonies. Les cellules MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-} ont été ensemencées à raison de 200 cellules par puit et cultivées pendant 7 jours. Les cellules ont été fixées et marquées au crystal violet. Les cellules ont été observées au microscope à contraste (X100) et les colonies ont été comptées à l'aide du logiciel VisionCapt. Les histogrammes représentant la moyenne \pm SD. * : significativité par rapport au contrôle ($p < 0,05$; Test t de Student). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Cette augmentation de la prolifération dans les différentes lignées est bien due à une augmentation du nombre de cellules vivantes et non à une diminution de la mort cellulaire

d'après un test d'exclusion au bleu Trypan permettant de quantifier la proportion des cellules mortes (Données non présentées).

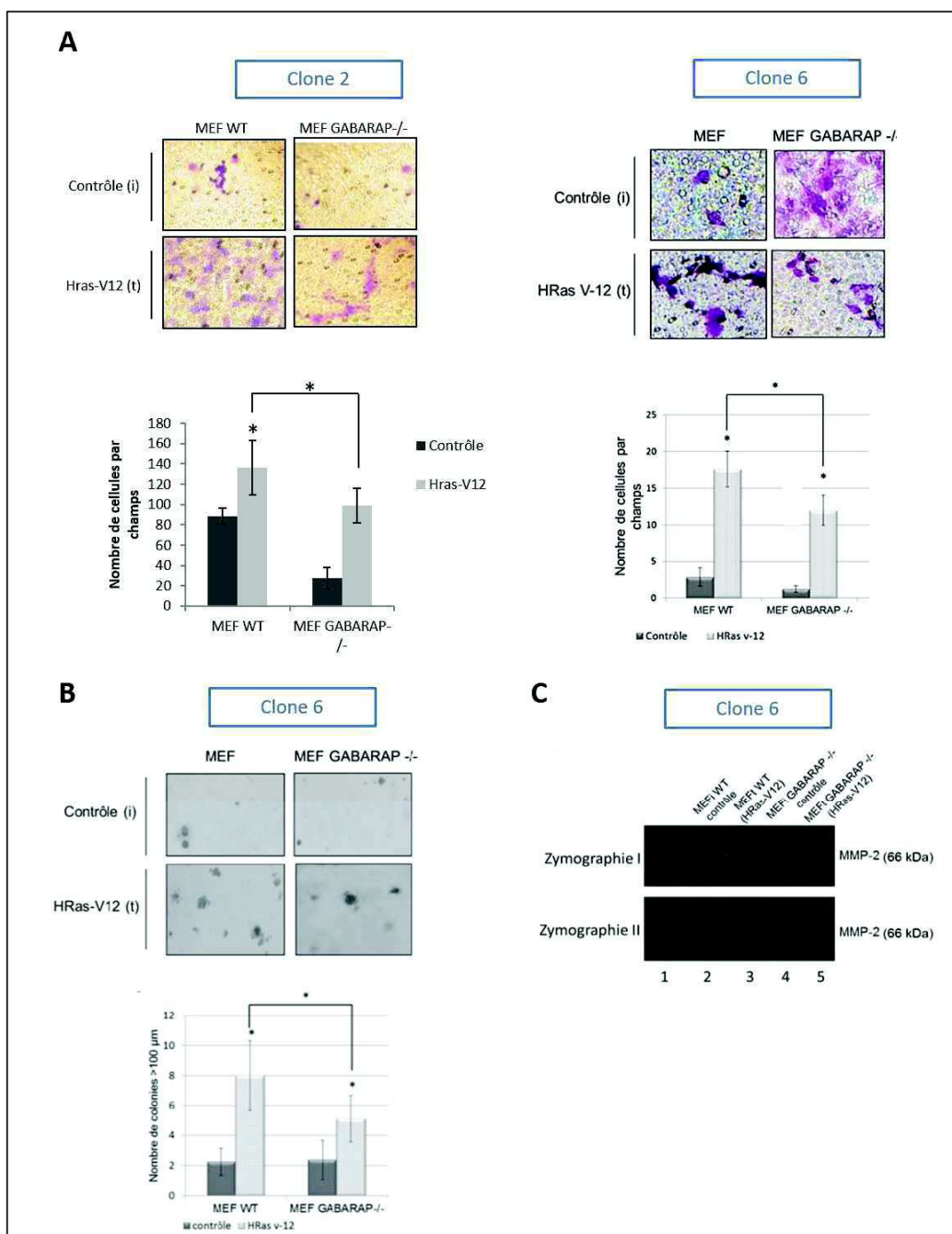


Figure 24: Migration, croissance indépendante de l'ancrage et activité des métalloprotéases des lignées MEFi et MEFt WT et GABARAP^{-/-}. (A) Etude de la migration cellulaire en chambre de Boyden des lignées MEFt GABARAP^{-/-} cl3 et cl6. Photographies des cellules situées sur la face inférieure des membranes après 24 heures d'incubation et histogramme représentant la moyenne \pm SD des cellules ayant migré (comptage sur 5 champs). Ces résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée en duplicat. * : significativité par rapport au contrôle ($p < 0,05$; Test t de Student). (B) Etude de la croissance indépendante de l'ancrage sur la lignée MEFt GABARAP^{-/-} cl6. Photographies au microscope à contraste de phase (X100) et histogramme représentant la moyenne du nombre de colonies $> 100 \mu\text{m}$ (comptage sur 10 champs). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les données indiquent la moyenne \pm SD. * : significativité par rapport au contrôle ($p < 0,05$; $n=10$; Test t de Student). (C) Etude par zymographie de l'activité protéolytique des métalloprotéases dans la lignée MEFt GABARAP^{-/-} cl6. Photographie d'un gel d'acrylamide 1% gélatine après coloration (bleu de Coomassie) et décoloration.

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude d'autres phénotypes cancéreux tels que la clonogénéité (**Figure 23B**) et la migration cellulaire (**Figure 24A**) pour les lignées MEFt GABARAP^{-/-} cl3 et cl6 mais également la croissance indépendante de l'ancrage (**Figure 24B**) et l'activité des métalloprotéases (**Figure 24C**) pour la lignée MEFt GABARAP^{-/-} cl6.

En effet, la lignée MEFt WT présente une augmentation des phénotypes cancéreux comparativement à la lignée MEFi WT. Comme précédemment, lors de l'invalidation de *GABARAP*, HRAS^{G12V} conduit à une augmentation des phénotypes cancéreux mais dans une moindre mesure comparativement aux cellules MEFt WT suggérant que l'invalidation de *GABARAP* perturbe la transformation cellulaire par HRAS^{G12V}.

2. Mise en place de modèles cellulaires de surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A

Au vu de la faible expression de GABARAPL1 dans les lignées MEFi, nous avons entrepris la mise en place de modèles cellulaires de surexpression de GABARAPL1 et de son mutant GABARAPL1 G116A. Pour cela, la lignée MEFi WT a été transfectée de manière stable avec les plasmides pcDNA3.1 vide ou pcDNA3.1-FLAG-GABARAPL1-6HIS ou pcDNA3.1-FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS.

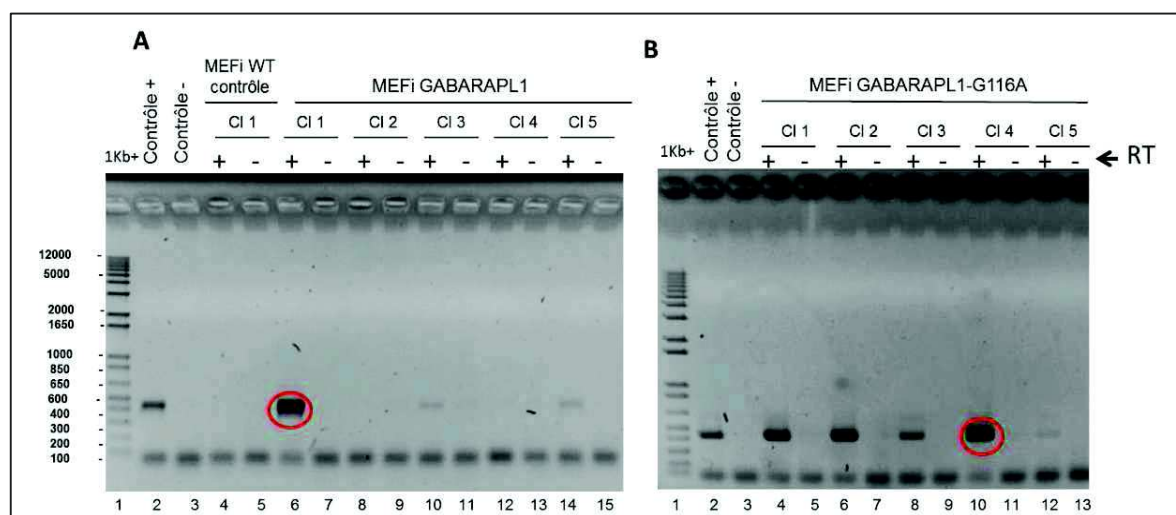


Figure 25 : Analyse par RT-PCR des clones stables MEFi GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A. Après une étape de reverse transcription, les produits de PCR des lignées MEFi GABARAPL1 (A) et GABARAPL1 G116A (B) ont été testés par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

Les clones isolés ont été testés après RT-PCR en utilisant une amorce sens située sur le vecteur pcDNA3.1 et une amorce reverse située dans la partie codante de *GABARAPL1* permettant ainsi de détecter uniquement *GABARAPL1* exogène. Une bande de taille attendue (450 pb) a été obtenue pour les clones 1, 3, 5 des lignées MEFi GABARAPL1 (**Figure 25A**) et

pour l'ensemble des clones MEFi GABARAPL1 G116A (**Figure 25B**). Le clone 1 des lignées MEFi GABARAPL1 et le clone 4 des lignées MEFi GABARAPL1 G116A ont été sélectionnés pour la suite des expériences.

L'expression protéique de GABARAPL1 a ensuite été analysée dans les deux clones sélectionnés. Les premières expériences n'ont pas permis de détecter ou très faiblement la surexpression des formes exogènes de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A (**Figure 26A**). Il a été montré préalablement au laboratoire que la protéine GABARAPL1 peut être dégradée par le protéasome (Seguin-Py *et al.*, 2012) et par autophagie (Chakrama *et al.*, 2010). Nous avons donc ensuite étudié le taux de protéine GABARAPL1 en présence ou en absence d'inhibiteurs de ces deux mécanismes de dégradation : MG132, un inhibiteur de protéasome et BafA1, un inhibiteur de l'autophagie (**Figure 26B**). Sans traitement, les lignées MEFi WT, GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A présentent un faible taux de GABARAPL1. Un traitement par la BafA1 ne modifie pas le taux de protéine GABARAPL1 dans nos différentes lignées. Au contraire, le traitement par MG132 permet de détecter de manière importante la protéine GABARAPL1 endogène mais également de détecter les protéines exogènes FLAG-GABARAPL1-6HIS et FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS.

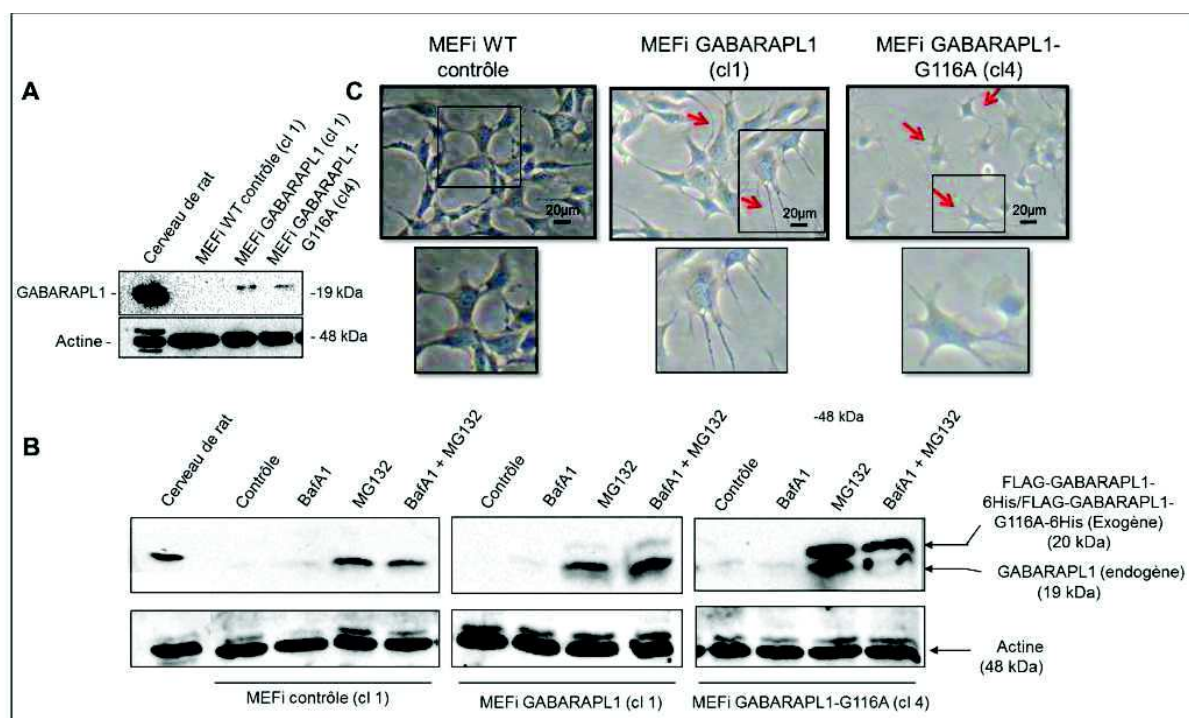
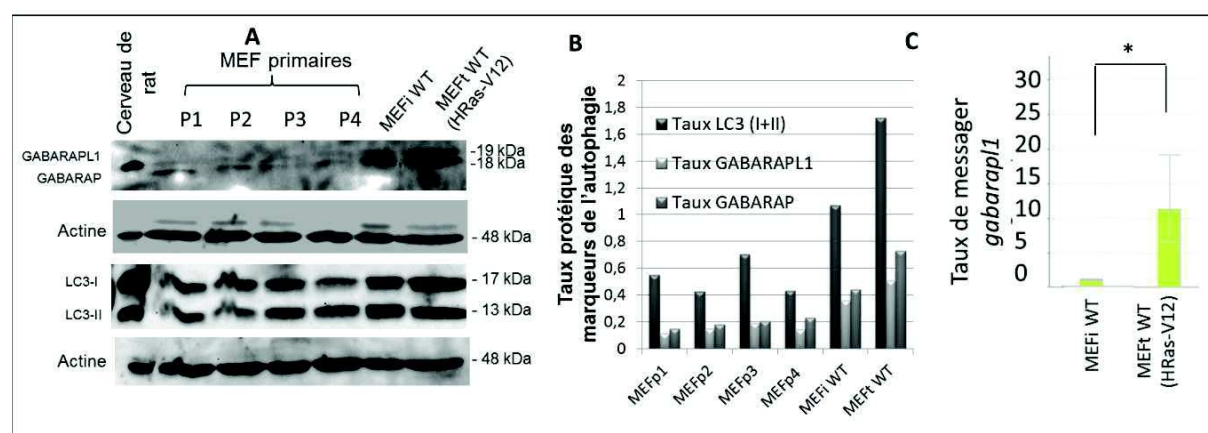


Figure 26 : Analyse de l'expression des protéines GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A et observation morphologique des lignées MEFi WT, GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A. (A) 50 µg de protéines ont été séparés par gel SDS-PAGE 12,5%. La révélation a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 (Proteintech) et actine. (B) Après traitement par 2 µM de MG132 pendant 15h et 100 nM de BafA1 pendant 2h, 50 µg de protéines ont été séparés par gel SDS-PAGE 12,5%. La révélation a été réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines GABARAPL1 (Proteintech) et actine. (C) Photographie des différentes lignées au microscope à contraste de phase X100.

Néanmoins, le taux de protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS est beaucoup moins important que le taux de la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS. D'autres clones devront donc être testés afin de trouver des clones exprimant ces deux protéines de manière similaire. D'un point de vue morphologique, les cellules MEFi sont fusiformes (**Figure 26C**). Un changement morphologique a été visualisé après transfection stable de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A. En effet, la lignée MEFi GABARAPL1 présente de longs prolongements cellulaires et semble être plus étalée comparativement à la lignée MEFi GABARAPL1 G116A qui présente une morphologie étoilée et une réduction de la taille cellulaire.

3. Etude des marqueurs de l'autophagie au cours de l'immortalisation et de la transformation cellulaire par HRAS^{G12V}

Afin d'étudier si l'immortalisation et/ou la transformation des cellules MEF a un impact sur le processus autophagique, l'expression endogène des marqueurs de l'autophagie GABARAPL1, GABARAP et LC3 a été étudiée. L'immortalisation par l'antigène T du virus SV40 et la transformation par HRAS^{G12V} conduit à une augmentation du taux de protéines GABARAPL1, GABARAP et LC3 (**Figure 27A et B**). Par contre, le taux de ces protéines ne varie pas en fonction du nombre de passages (de P1 à P4) dans les cellules MEFp.



Afin de vérifier si l'augmentation de GABARAPL1 au cours de la transformation est due à une augmentation du taux de messageur, nous avons étudié le taux de messageur *GABARAPL1* dans les cellules MEFi et MEFt WT (**Figure 27C**). Une forte augmentation de l'ARNm

GABARAPL1 (X10) est observée dans les cellules MEFt WT comparativement aux cellules MEFi WT. Une étude similaire devra être réalisée afin d'étudier les taux de messagers *GABARAP* et *LC3*.

IV. ETUDE DU PROTEOME GLOBAL DES LIGNEES SUREXPRIMANT GABARAPL1 OU GABARAPL1 G116A

En parallèle, une étude du protéome global de nos lignées MCF-7 C, *GABARAPL1* et *GABARAPL1* G116A a été entreprise par spectrométrie de masse en collaboration avec la plateforme protéomique CliPP (CLinical and Innovation Proteomic Platform, Bourgogne/Franche-Comté). L'analyse du protéome permettra d'établir une cartographie protéique complète des lignées surexprimant *GABARAPL1* ou *GABARAPL1* G116A permettant ainsi d'identifier les protéines et voies moléculaires régulées par *GABARAPL1* de manière dépendante ou non de sa glycine en position 116.

Les échantillons protéiques de nos différentes lignées cellulaires (10 µg de protéines totales) ont été chargés sur un gel 15% qui a ensuite été coloré avec une solution de coloration appelée Blue Silver (**Figure 28**). A première vue, la surexpression de *GABARAPL1* ou *GABARAPL1* G116A ne modifie pas le protéome global, il a donc été nécessaire d'étudier plus précisément les protéines minoritaires. Dans un premier temps, les zones 3, 5 et 7, présentant les bandes les plus intenses, ont été exclues tandis que les zones 1, 2, 4, 6 et 8, présentant les bandes de plus faible intensité ont été découpées et utilisées pour la suite de l'analyse.

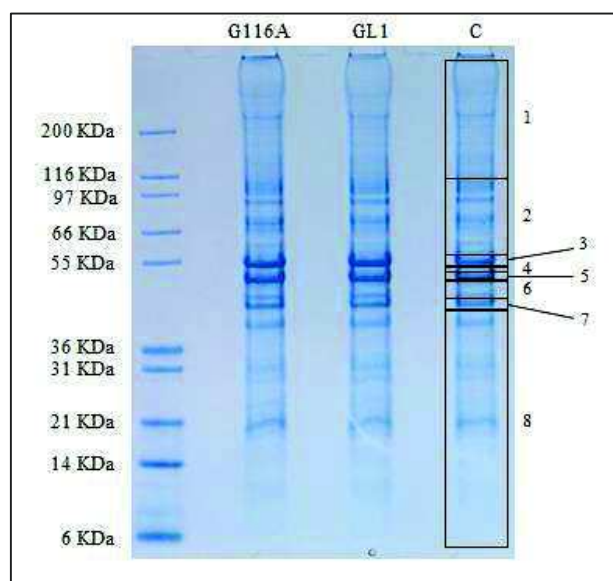


Figure 28 : Protéome global des lignées cellulaires MCF-7 C, *GABARAPL1* et *GABARAPL1* G116A. Les protéines totales (10µg) extraites des différentes lignées cellulaires ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 15%. Les protéines ont été colorées à l'aide du réactif Bleu Silver pendant 2h puis décolorées avec de l'eau distillée. Les zones 1, 2, 4, 6 et 8 ont ensuite été découpées et utilisées pour la suite des analyses.

L'analyse protéomique a permis d'identifier de très nombreuses protéines par zone (**Tableau 6**). Une différence au niveau du nombre de protéines identifiées peut être observée entre nos différentes lignées. En effet, la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A conduit à une diminution du nombre total de protéines sur l'ensemble des bandes étudiées : 2478 et 2132 protéines observées respectivement, comparativement à 3247 protéines pour les cellules C. Ces observations suggèrent que la surexpression de GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A favorise la dégradation de protéines. Ces différences ne semblent pas être liées à la quantité initiale de protéines utilisée puisque ces différences ne sont pas linéaires d'un échantillon à un autre. Les contrôles adéquats ont été réalisés et indiquent que ces différences ne sont pas non plus en lien avec un biais analytique ou une contamination et ont donc un sens biologique.

Bande	Nombre de protéines		
	Contrôle C	GL1	GL1G116A
001	1040	758	374
002	916	778	631
004	117	119	81
006	269	187	148
008	905	636	898

Tableau 6 : Nombre de protéines identifiées dans les lignées MCF-7 C, GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A en fonction des zones étudiées.

L'analyse en spectrométrie de masse a permis l'obtention de données brutes indiquant le nombre de peptides de nombreuses protéines (environ 4500) présents dans chacune de nos lignées cellulaires (**Figure 29A**). Le nombre de peptides rend compte de la quantité de la protéine dans chacune de nos lignées cellulaires.

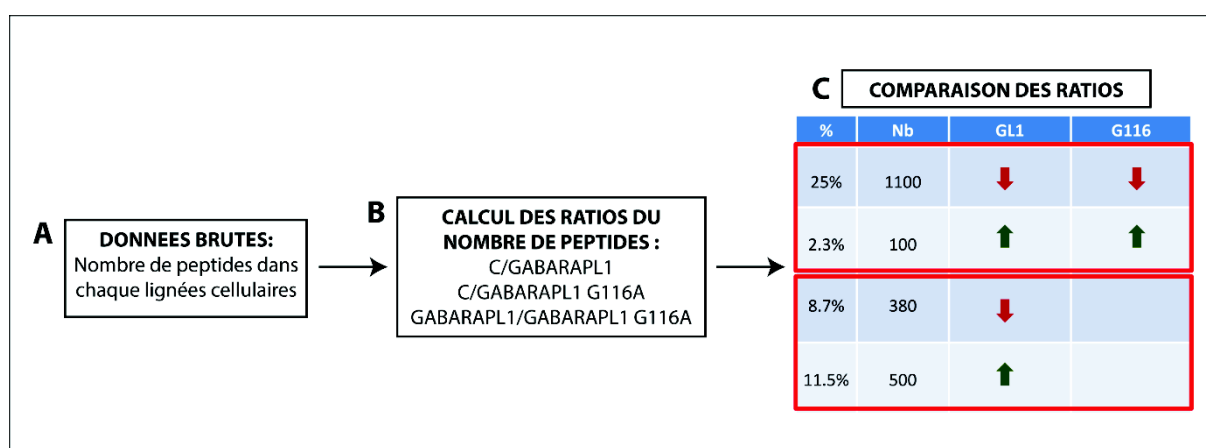


Figure 29 : Méthode d'analyse préliminaire des résultats de spectrométrie de masse. (A) Obtention de données brutes présentant le nombre de peptides de chaque protéine dans les différentes lignées cellulaires. (B) Comparaison du nombre de peptides dans les différentes lignées cellulaires par le calcul de ratios. (C) Comparaison des ratios obtenus permettant l'identification des protéines régulées de manière dépendante ou indépendante de la localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes.

Afin d'identifier les protéines régulées par GABARAPL1 de manière dépendante ou indépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes, nous avons comparé le nombre de peptides des différentes protéines présentes dans nos lignées MCF-7 C, GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A à l'aide de ratios (**Figure 29 B**). L'analyse de ces ratios nous a permis de mettre en évidence 4 familles différentes de protéines en fonction de leur schéma de régulation : i) les protéines augmentant lors de la surexpression de GABARAPL1 (11,5%), ii) les protéines augmentant lors de la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116 (2,3%), iii) les protéines diminuant lors de la surexpression de GABARAPL1 (8,7%) et iii) les protéines diminuant lors de la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A (25%) (**Figure 29C**). La surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A conduit majoritairement à une diminution de l'expression des protéines (25%), confirmant que GABARAPL1 est principalement impliquée dans des processus de dégradation tels que l'autophagie. Le **Tableau 7** présente des exemples de protéines impliquées dans l'autophagie et les fonctions lysosomales et étant régulées dans nos lignées de surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A.

Fonctions	Protéines	Ratio C/GL1	Ratio C/G116A	Ratio GL1/G116A	GL1	GL1 G116A
Autophagie	ULK2	8000	8000	1	↓	▣
	S10A8	7000	7000	1	↓	↓
	AKT1	7000	7000	1	↓	↓
	EPG5	6000	6000	1	↓	↓
	RAB1B	7000	1	7000	▣	
	B2CL1	2000	1	2000	▣	
	BAD	0,0005	1	0,0005	↑	
	LAMP1	0,0003	1	0,0003	↑	
Lysosome	PPT1	13000	13000	1	↓	▣
	CTR9	4000	4000	1	↓	↓
	GCC2	2000	2000	1	↓	↓
	FNBP1	2000	2000	1	↓	↓
	COR1A	8000	8000	1	↓	↓
	CYTC	2000	1	2000	▣	

Tableau 7 : Exemple de protéines impliquées dans l'autophagie et les fonctions lysosomales régulées dans les cellules surexprimant GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A. Les ratios indiqués en rouge représentent une diminution des protéines dans les lignées surexprimant GL1 ou GL1 G116A tandis que les ratios indiqués en vert représentent une augmentation des protéines dans les lignées surexprimant GL1 ou GL1 G116A.

Les données obtenues par spectrométrie de masse permettent de mettre en évidence que de nombreuses protéines sont régulées lors de la surexpression de GABARAPL1 que ce soit de

manière dépendante ou indépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes. Une étude plus approfondie de l'ensemble des résultats obtenus sera nécessaire afin d'identifier toutes les voies moléculaires régulées dans nos lignées cellulaires et afin d'établir la significativité des résultats. Une analyse biostatistique est en cours sur 3 expériences indépendantes. Une analyse bioinformatique est également en cours afin d'identifier les voies métaboliques et les voies moléculaires régulées suite à la surexpression de GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A. Les protéines identifiées comme étant régulées par GABARAPL1, de manière dépendante ou indépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes, fourniront de nouvelles pistes à explorer pour mieux comprendre le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie mais également dans d'autres mécanismes.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de mes travaux de thèse a consisté en l'étude du rôle de deux protéines QSOX1 et GABARAPL1 dans l'autophagie et le cancer, deux mécanismes étroitement liés. Ces travaux de thèse ont permis d'étudier le rôle de QSOX1 et GABARAPL1 dans l'autophagie et de déterminer l'implication de l'autophagie dans les fonctions liées aux cellules cancéreuses de ces deux protéines. Ces travaux ont permis de mieux caractériser et d'identifier des liens entre autophagie, stress cellulaire, métabolisme et cancer.

I. AUTOPHAGIE, STRESS CELLULAIRE ET CANCER

Un lien étroit existe entre autophagie et stress cellulaire. En effet, l'autophagie peut être induite suite à un stress oxydant ou un stress du RE pour maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est également impliquée dans le cancer et peut avoir un rôle pro- ou anti-tumoral. La première partie de mes travaux de thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois **l'implication de QSOX1-S, une protéine permettant la protection contre les stress, dans l'autophagie**. De plus, mes travaux ont suggéré que **le rôle de QSOX1-S lié aux cellules cancéreuses pourrait être associé à ses fonctions dans l'autophagie**.

Au cours de ce travail décrit dans la **publication I**, nous avons pu mettre en évidence que **l'expression de QSOX1-S augmente lors de l'induction de l'autophagie suite à une carence en acides aminés et permet d'augmenter la survie des cellules suite à ce stress**. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus concernant le stress oxydant et le stress du RE et confirme le rôle de cette protéine dans la survie des cellules en cas de stress (Morel *et al.*, 2007). L'autophagie est un mécanisme qui permet normalement le maintien de l'homéostasie cellulaire mais plusieurs études ont également pu mettre en évidence un rôle de ce mécanisme dans la mort autophagique. En effet, la mort autophagique peut survenir lorsque l'autophagie est excessive ou que l'autophagie est insuffisante pour permettre la survie des cellules suite à un stress (Fulda & Kogel, 2015; Tait *et al.*, 2014). Le double rôle de l'autophagie, en tant que mécanisme de survie ou de mort cellulaire, semble dépendre de sa durée et de son ampleur. Ainsi, lors d'une carence prolongée en acides aminés, QSOX1-S pourrait empêcher une autophagie excessive et/ou la mort autophagique permettant ainsi aux cellules de survivre à ce stress. Il serait intéressant par la suite d'étudier, de manière plus approfondie, la mort autophagique en utilisant des inhibiteurs de l'autophagie et d'étudier l'implication d'autres morts cellulaires telles que l'apoptose.

Nous avons également démontré que **QSOX1-S inhibe l'autophagie basale et induite en réduisant la fusion autophagosome/lysosome**. En effet, QSOX1-S régule le taux des marqueurs de l'autophagie p62 et LC3-II ainsi que le nombre de vésicules GFP-LC3 positives en inhibant le flux autophagique. De plus, QSOX1-S empêche la colocalisation GFP-LC3 (marqueur des autophagosomes) et LysoTracker Red (marqueur des vésicules acides) ou LAMP1 (marqueur des lysosomes), suggérant que QSOX1-S inhibe la fusion autophagosome/lysosome. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors d'une recherche systématique des acteurs impliqués dans la régulation de l'autophagie réalisée sur plus de 20000 gènes. En effet, cette étude a suggéré que l'extinction de QSOX1 induit l'autophagie dans des cellules de neuroblastomes H4 après quantification des vésicules GFP-LC3 positives (Lipinski *et al.*, 2010b). Le mécanisme par lequel QSOX1-S peut inhiber l'autophagie reste encore à déterminer. La seule protéine partenaire de QSOX1 identifiée à ce jour est l'UBIQUILINE-4, protéine membre de la famille ubiquiline impliquée dans le processus autophagique (Lim *et al.*, 2006). Il a été mis en évidence que l'UBIQUILINE-4 agit avec l'UBIQUILINE-1 pour induire la fusion autophagosome/lysosome. En effet, l'UBIQUILINE-4 interagit directement avec LC3 et peut ainsi amener l'UBIQUILINE-1 aux autophagosomes durant l'autophagie (Lee *et al.*, 2013a). Localisée aux autophagosomes, l'UBIQUILINE-1 peut alors réguler positivement l'autophagie en agissant plus particulièrement sur la fusion autophagosome/lysosome (N'Diaye *et al.*, 2009a; N'Diaye *et al.*, 2009b; Rothenberg *et al.*, 2010). Nous pouvons donc supposer que la protéine QSOX1 pourrait par son interaction avec l'UBIQUILINE-4 empêcher le recrutement de l'UBIQUILINE-1 à la machinerie de l'autophagie et donc inhiber la fusion autophagosome-lysosome.

Une recherche systématique réalisée sur plus de 200 gènes a également suggéré que l'extinction de *QSOX1* (*QSCN6*) induit l'autophagie en absence mais pas en présence d'un anti-oxydant NAC (N-acétyl cystéine). Les ERO ont été identifiées comme des inducteurs précoces de l'autophagie suite à une carence en nutriments en régulant les protéines impliquées dans différentes étapes de ce processus telles que la protéase ATG4 (Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été mis en évidence chez la levure que cette régulation d'ATG4 est une régulation d'oxydo-réduction d'un pont disulfure (Perez-Perez *et al.*, 2014). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par QSOX1 pourrait s'expliquer par les fonctions de cette protéine dans la protection contre les stress oxydants ou par ses fonctions de sulfhydryl oxydase permettant la création de ponts disulfure dans des protéines en lien avec l'autophagie. L'étude systématique a également suggéré que QSOX1 pourrait réguler négativement l'activité de la PI3K (ou VPS34) (Lipinski *et al.*, 2010b). Lors de l'autophagie, la fusion autophagosome/lysosome est

régulée positivement par le complexe UVRAG-VPS34-BECLINE 1, nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle QSOX1-S pourrait inhiber la fusion autophagosome/lysosome en interférant avec ce complexe. Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier l'autophagie après traitement par du NAC et l'activité de la PI3K dans nos modèles d'extinction et de surexpression de QSOX1-S.

De plus, comme décrit précédemment, la réponse UPR et les stress oxydants sont des inducteurs importants de l'autophagie. Il a été mis en évidence au sein de notre laboratoire que QSOX1-S protège les cellules contre la réponse UPR et les stress oxydants. Ainsi, nous pouvons supposer que QSOX1-S pourrait inhiber l'autophagie de manière indirecte, en bloquant l'induction de ce mécanisme par la réponse UPR ou les stress oxydants. Il serait donc intéressant par la suite d'approfondir l'étude du rôle de QSOX1-S dans l'autophagie afin de mieux comprendre l'implication ou non de la réponse UPR et des stress oxydants dans ce mécanisme et le cas échéant de tenter d'identifier les voies moléculaires impliquées.

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle de QSOX1 dans le cancer. Néanmoins, le rôle de QSOX1 semble complexe, principalement au vu de l'existence de ses différents transcrits *QSOX1-S* et *QSOX1-L*. Ces transcrits obtenus après épissage alternatif présentent des schémas d'expression différents selon le type de cancer et le rôle de chaque transcrit reste encore à élucider. Ainsi, il a été mis en évidence que QSOX1 favorise les phénotypes des cellules de cancer du pancréas (Katchman *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013) tandis que QSOX1-S réduit les phénotypes des cellules de cancer du sein *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* (Pernodet *et al.*, 2012). De plus, l'expression de QSOX1 est associée à un facteur de bon ou mauvais pronostic en fonction du type de cancer (Araujo *et al.*, 2014; Katchman *et al.*, 2013; Pernodet *et al.*, 2012). Comme décrit précédemment dans ce manuscrit, l'autophagie peut agir comme un mécanisme pro-tumoral ou anti-tumoral en fonction du type de tumeur et du stade de développement (Avalos *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2015). Notre étude a permis de suggérer que **QSOX1-S pourrait inhiber les phénotypes cancéreux via sa fonction dans l'autophagie**. En effet, l'inhibition de l'autophagie par des inhibiteurs tels que le 3-MA et la wortmannine mime l'effet de QSOX1-S sur l'invasion cellulaire. Ces résultats suggèrent également que dans nos modèles cellulaires, l'autophagie a un rôle pro-tumoral comme décrit précédemment dans le cancer du sein et du pancréas (Amaravadi, 2012; Gong *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'étudier l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur d'autres phénotypes cancéreux tels que la migration cellulaire ou la prolifération cellulaire. Il serait également intéressant d'inhiber de façon plus spécifique l'autophagie en utilisant des siRNA contre les transcrits *ATG5* ou *ATG7* afin de limiter

l'utilisation de drogues chimiques, beaucoup moins spécifique. En effet, ces drogues chimiques inhibent l'autophagie mais peuvent également, selon les concentrations et le temps de traitement, inhiber d'autres mécanismes.

Nous avons également étudié la dérégulation de l'autophagie dans les tumeurs obtenues *in vivo* suite à l'injection des lignées d'extinction de QSOX1-S dans des souris NOG. Nous avons pour cela analysé l'expression des marqueurs de l'autophagie LC3 et p62. Aucune différence n'a été observée concernant le taux de LC3 entre les différentes tumeurs. Au contraire, la présence de QSOX1-S dans les tumeurs est associée à un fort taux de p62. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vitro* sur nos modèles cellulaires et suggèrent que QSOX1-S, par son rôle inhibiteur sur l'autophagie, peut inhiber la croissance tumorale *in vivo*. Comme décrit précédemment, ces résultats suggèrent que l'autophagie présente un rôle pro-tumoral dans l'établissement de la tumeur et la progression tumorale (Mathew *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2011). P62 est une protéine multi-domaines dégradée spécifiquement par autophagie et jouant un rôle dans de nombreuses voies de signalisation telles que la réponse anti-oxydante, l'inflammation, le métabolisme et le cancer (Puissant *et al.*, 2012). De plus, p62 est régulé de façon transcriptionnelle, nous ne pouvons donc pas exclure que le fort taux de p62 observé dans les tumeurs exprimant QSOX1-S ne soit pas associé à une dérégulation de l'autophagie. Afin de confirmer l'implication de l'autophagie dans les fonctions de QSOX1-S sur la croissance tumorale *in vivo*, il serait nécessaire d'étudier l'effet de l'extinction ou de la surexpression de QSOX1-S sur la croissance tumorale lors de l'inhibition de l'autophagie. Des études supplémentaires semblent également nécessaires afin d'identifier les facteurs pouvant expliquer les résultats contradictoires de la littérature concernant le rôle de QSOX1 dans le cancer. Nous pouvons supposer que le rôle de QSOX1 peut varier en fonction du transcrite de QSOX1 étudié, du type de cancer mais également du taux d'autophagie dans ces cancers.

Suite à la réorientation thématique de notre laboratoire, nos recherches se sont ensuite poursuivies plus particulièrement sur le rôle de GABARAPL1 ou des membres de la famille GABARAP dans l'autophagie et le cancer.

II. PROTEINES ATG8 ET AUTOPHAGIE

La famille ATG8 comprend les sous-familles LC3 et GABARAP, impliquées dans l'autophagie. Le rôle de la sous-famille LC3 dans l'autophagie a été beaucoup plus étudié que celui de la sous-famille GABARAP. Néanmoins, il a été suggéré que les membres de la sous-famille GABARAP pourraient intervenir lors des étapes tardives de la maturation des autophagosomes alors que les membres de la sous-famille LC3 interviendraient lors de l'élongation du phagophore (Weidberg *et al.*, 2010). La grande majorité des études concernant les membres de la famille ATG8 analyse le rôle de l'ensemble des protéines de chaque sous-famille et non pas le rôle de chaque protéine individuellement. Nous avons donc voulu étudier de manière plus approfondie le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie des cellules de cancer du sein. Ces travaux sont décrits dans les **publications II et III**.

La protéine GABARAPL1 possède une glycine en position 116 conservée, nécessaire à son rôle lors de l'autophagie (Chakrama *et al.*, 2010). La caractérisation de la lignée surexprimant le mutant GABARAPL1 G116A nous a permis de mettre en évidence que **la glycine C-terminale de GABARAPL1 est nécessaire à sa lipidation et à son association aux autophagosomes**. Ceci est en accord avec d'autres études décrivant des résultats similaires pour la mutation G120A pour LC3 et G116A pour GABARAP et GABARAPL2 (Kabeya *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2004; Tanida *et al.*, 2003). Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée concernant l'effet de ces mutations sur le rôle des membres de la famille ATG8 dans l'autophagie et le cancer. Les études menées ont uniquement examiné l'effet de ces mutations sur le transport intracellulaire des protéines. En effet, la mutation G116A ne modifie pas l'interaction de GABARAP avec le récepteur à l'angiotensine mais empêche l'interaction de cette protéine avec le récepteur GABA_A (Alam *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2007). Il a également été mis en évidence que la mutation G116A empêche l'interaction de GABARAP, mais pas de GABARAPL1, avec le récepteur aux κ opioïdes (Chen *et al.*, 2011). Dans notre étude, nous avons montré que la mutation G116A ne modifie pas l'interaction de GABARAPL1 avec la tubuline et n'empêche pas sa dégradation par le protéasome, suggérant que **la mutation G116A inhibe spécifiquement la conjugaison de GABARAPL1 aux autophagosomes, sans perturber les autres caractéristiques de GABARAPL1**.

L'étude de l'autophagie par l'analyse du marqueur LC3-II dans des modèles de surexpression et d'extinction de GABARAPL1, nous a permis de mettre en évidence que **GABARAPL1 augmente le flux autophagique**. Nous avons également démontré que, lors de

l'autophagie, GABARAPL1 n'agit pas uniquement **au niveau des étapes tardives** (acidification des lysosomes et fusion autophagosome/lysosome) comme cela avait été suggéré précédemment (Weidberg *et al.*, 2010) mais aussi **au niveau des étapes précoces** (activation de mTOR et d'ULK1). De plus, l'utilisation du mutant G116A, nous a permis de mettre en évidence que GABARAPL1 régule l'autophagie basale et les étapes précoces de l'autophagie de manière indépendante de sa localisation aux autophagosomes. Au contraire, GABARAPL1 semble réguler l'autophagie induite et les étapes tardives de l'autophagie de manière dépendante de sa localisation aux autophagosomes.

Concernant le rôle de GABARAPL1 dans les étapes précoces de l'autophagie, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle GABARAPL1 par son interaction avec ULK1 (Alemu *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2012) pourrait activer cette protéine qui serait alors capable d'inhiber mTOR. En effet, ULK1 peut inhiber mTOR en phosphorylant RAPTOR, un membre du complexe mTORC1, conduisant à une boucle de régulation positive de l'autophagie (Dunlop *et al.*, 2011). Il a également été mis en évidence au sein de notre laboratoire que GABARAPL1 interagit avec AMPK (Données non publiées) connue pour inhiber mTOR et activer ULK1 par phosphorylation (Egan *et al.*, 2011a; Gwinn *et al.*, 2008; Inoki *et al.*, 2003). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle GABARAPL1 pourrait agir au niveau des étapes précoces de l'autophagie *via* son interaction avec AMPK. Il serait donc intéressant de vérifier si GABARAPL1 G116A, comme GABARAPL1, est capable d'interagir avec AMPK et d'étudier de manière plus approfondie la régulation de cette kinase dans nos différentes lignées. Nos résultats semblent indiquer que la régulation de l'autophagie basale par GABARAPL1 est associée à une régulation des étapes précoces de ce mécanisme, ce qui est en accord avec une étude mettant en évidence un lien entre l'activité de mTOR et l'autophagie basale (Musiwaro *et al.*, 2013).

Récemment, il a été démontré que les membres de la famille ATG8, localisés aux autophagosomes, peuvent favoriser la fusion autophagosome/lysosome en interagissant avec la protéine PLEKHM1 à la surface du lysosome (McEwan & Dikic, 2015; McEwan *et al.*, 2015). Il a également été mis en évidence que les membres de la famille GABARAP sont capables de recruter la kinase PI4KII α aux autophagosomes conduisant à la production de PI4P, une étape critique de la fusion autophagosome/lysosome (Wang *et al.*, 2015). Ces résultats peuvent expliquer l'augmentation de l'activité des lysosomes et de la fusion autophagosome/lysosome observée en présence de GABARAPL1 liée aux autophagosomes mais pas en présence de GABARAPL1 G116A cytosolique. Les microtubules sont également impliqués dans la régulation de la fusion autophagosome/lysosome en relocalisant les organelles au niveau

périnucléaire durant l'autophagie (Fass *et al.*, 2006; Mackeh *et al.*, 2013) et il a été mis en évidence que GABARAPL1 augmente la polymérisation de la tubuline (Mansuy *et al.*, 2004). Nous aurions donc pu émettre l'hypothèse selon laquelle GABARAPL1 régule la fusion autophagosome/lysosome par son interaction avec la tubuline. Néanmoins, les résultats obtenus par P-LISA indiquent que GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A interagissent de manière similaire avec la tubuline, suggérant que l'effet de GABARAPL1 sur les étapes tardives de l'autophagie ne fait pas intervenir son interaction avec la tubuline. Des études précédentes ont mis en évidence que les gènes de l'autophagie et des lysosomes sont régulés transcriptionnellement de manière coordonnée par le facteur de transcription TFEB (Sardiello & Ballabio, 2009; Sardiello *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2011). Il serait intéressant pour la suite d'étudier la régulation du facteur de transcription TFEB dans nos lignées d'extinction et de surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A. De plus, lors de l'autophagie, l'activation des lysosomes requiert deux mécanismes : l'inhibition de mTOR et la fusion autophagosome/lysosome (Zhou *et al.*, 2013). Ces données peuvent expliquer l'augmentation de l'activité des lysosomes observée dans les cellules surexprimant GABARAPL1 qui présentent une inhibition de mTOR et une augmentation de la fusion autophagosome/lysosome contrairement aux cellules surexprimant GABARAPL1 G116A qui présentent uniquement l'inhibition de mTOR.

III. PROTEINES ATG8, AUTOPHAGIE ET CANCER

L'expression de la protéine GABARAPL1 est associée à un marqueur de bon pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein et sa surexpression inhibe la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*, suggérant un rôle suppresseur de tumeur de cette protéine (Berthier *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Etant donné le lien étroit entre autophagie et cancer, nous avons voulu déterminer si le rôle de GABARAPL1 en tant que suppresseur de tumeur était lié à sa localisation au niveau des autophagosomes lors de l'autophagie. Nous avons pour cela utilisé le mutant GABARAPL1 G116A qui, comme nous l'avons montré précédemment, ne peut plus se lier aux autophagosomes.

Nous avons d'abord confirmé le **rôle suppresseur de tumeur de GABARAPL1 *in vitro* dans nos modèles d'extinction et de surexpression** de cette protéine par l'étude de différents phénotypes cancéreux tels que la prolifération, la clonogénicité ou l'invasion. De plus, nous

avons mis en évidence que la mutation G116A altère l'effet de GABARAPL1 sur l'invasion, la prolifération, la clonogénicité, l'adhérence et la croissance indépendante de l'ancrage *in vitro*. Néanmoins, de façon surprenante, la mutation G116A n'altère pas l'effet de GABARAPL1 sur la migration *in vitro*. Ces résultats suggèrent que GABARAPL1 pourrait agir sur les cellules cancéreuses de manière dépendante ou indépendante de sa localisation aux autophagosomes. Les résultats obtenus sur la migration cellulaire sont en accord avec des données de la littérature suggérant qu'une augmentation de l'autophagie suite à l'inhibition de mTOR peut réduire la migration des cellules HeLa en régulant l'expression de la β 1-intégrine à la surface cellulaire (Tuloup-Minguez *et al.*, 2013).

Afin de mieux comprendre l'implication de la localisation de GABARAPL1 aux autophagosomes dans sa fonction suppresseur de tumeur, nous avons étudié la croissance tumorale après injection de nos modèles cellulaires à des souris Rag γ /c. La surexpression de GABARAPL1 conduit à une diminution de la croissance tumorale confirmant les résultats obtenus chez la souris *nude* (Zhang *et al.*, 2011). La surexpression de GABARAPL1 G116A conduit également à une diminution de la croissance tumorale suggérant que la localisation de GABARAPL1 aux autophagosomes n'est pas nécessaire à ses fonctions de suppresseur de tumeur *in vivo*.

Au vu de ces résultats, des études supplémentaires semblent indispensables afin de comprendre les différences obtenues sur les phénotypes cancéreux *in vitro* et *in vivo* et d'identifier les mécanismes exacts mis en jeu. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A sur les phénotypes cancéreux *in vitro* à l'aide de culture cellulaire tridimensionnelle en support non-adhérent, aussi appelée mammosphère dans le cas de cellules de cancer du sein. En culture cellulaire tridimensionnelle, les cellules prolifèrent sous forme de sphéroïdes reproduisant ainsi l'organisation de la tumeur *in vivo*. Nous pouvons cependant émettre plusieurs hypothèses sur les mécanismes d'action mis en jeu. Nous pouvons supposer que le rôle suppresseur de tumeur de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A est dépendant de leur rôle lors des étapes précoces de l'autophagie puisque ces deux protéines conduisent à une augmentation du flux autophagique basal en régulant la phosphorylation de la protéine ULK1. Nous pouvons également émettre l'hypothèse selon laquelle GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A pourraient avoir un rôle de suppresseur de tumeur en inhibant mTOR qui est impliquée dans la prolifération et la progression tumorale (Cornu *et al.*, 2013; Laplante & Sabatini, 2012; Mamane *et al.*, 2006). Nous ne pouvons tout de même pas exclure que GABARAPL1 puisse présenter un rôle de suppresseur de tumeur de manière indépendante de son rôle dans l'autophagie. C'est par exemple le cas de BECLIN 1,

une protéine impliquée dans l'initiation de l'autophagie et un gène suppresseur de tumeur fréquemment délété dans le cancer (Aita *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1999; Qu *et al.*, 2003). En effet, BECLIN 1 peut inhiber la tumorigénèse en inhibant la stabilisation de MCL-1 ou l'activation de WNT1 (wingless-type MMTV integration site family, member 1), deux mécanismes indépendants de l'autophagie (Cicchini *et al.*, 2014; Elgendy *et al.*, 2014).

IV. METABOLISME, AUTOPHAGIE SELECTIVE ET CANCER

GABARAPL1, comme les autres membres de la famille ATG8, est impliquée dans l'autophagie sélective. En effet, GABARAPL1 peut interagir avec p62 et NBR1 permettant la dégradation des agrégats ubiquitinylés (Pankiv *et al.*, 2007; Rozenknop *et al.*, 2011). Il a été suggéré que GABARAPL1 pourrait agir comme suppresseur de tumeur en permettant la dégradation de DVL2 par autophagie sélective *via* son interaction avec p62. Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse à l'aide du mutant GABARAPL1 G116A qui n'intervient plus dans l'autophagie sélective (**publication II**). En effet, nous avons mis en évidence à l'aide du mutant GABARAPL1 G116A que **la localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes est nécessaire à son interaction avec p62 et donc à son rôle dans l'autophagie sélective des agrégats ubiquitinylés**. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans la littérature démontrant que p62 interagit préférentiellement avec la forme lipidée de LC3, LC3-II afin d'être recrutée de manière efficace aux autophagosomes puis transportée au sein de l'autophagolysosome (Gao *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011). De manière intéressante, il a également été montré qu'une mutation sur le motif LIR de LC3 inhibe l'interaction entre LC3 et p62 et inhibe la dégradation de substrats spécifiques par autophagie sélective sans affecter l'autophagie non sélective (Tung *et al.*, 2010). Comme indiqué précédemment, GABARAPL1 G116A comme GABARAPL1 inhibe la croissance tumorale *in vivo*. Ainsi, nous pouvons donc supposer que les fonctions de GABARAPL1 dans l'autophagie sélective des agrégats ubiquitinylés ne sont pas essentielles à ses fonctions de suppresseur de tumeur. Il serait intéressant par la suite d'étudier l'effet de la mutation G116A sur l'interaction de GABARAPL1 avec d'autres adaptateurs impliqués dans l'autophagie sélective des agrégats ubiquitinylés tels que NBR1, qui présente une structure et des fonctions similaires à p62.

Il a également été suggéré que GABARAPL1 pourrait intervenir dans d'autres types d'autophagie sélective tels que la dégradation de mitochondries par mitophagie *via* son

interaction avec NIX et la dégradation du glycogène par glycophagie *via* son interaction avec STDB1 (Jiang *et al.*, 2010b; Novak *et al.*, 2010). Ceci suggère que GABARAPL1 peut jouer un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire et la production d'énergie, qui pourrait rendre compte de ses fonctions de suppresseur de tumeur. En effet, les cellules de cancer du sein requièrent une quantité élevée d'ATP pour proliférer et les tumeurs ont besoin d'un processus autophagique actif leur permettant de survivre en conditions hypoxiques et lors de stress oxydant (Debnath, 2011). Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse à l'aide de nos modèles d'extinction de GABARAPL1. L'étude des fonctions mitochondriales a permis de mettre en évidence que l'extinction de GABARAPL1 augmente le potentiel mitochondrial, le facteur de biogenèse mitochondrial PPARGC1A (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha), la protéine mitochondriale VDAC1 mais aussi l'ADN mitochondrial total et endommagé, suggérant une fonction de GABARAPL1 dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale. L'extinction de GABARAPL1 conduit également à une augmentation du taux d'ATP démontrant que, malgré une diminution de la qualité des mitochondries, la population globale de ces organites est capable de fournir l'énergie nécessaire aux cellules. Ceci pourrait s'expliquer par une activation de la biogenèse mitochondriale afin de restaurer l'intégrité de la population des mitochondries. Ces résultats soutiennent l'hypothèse qu'un faible taux de GABARAPL1 dans les cellules de cancer du sein inhibe le flux autophagique et donc la dégradation des mitochondries conduisant à leur accumulation et à l'augmentation de la respiration, du taux d'ATP et de GSH. Cette augmentation de la capacité énergétique et anti-oxydante en réponse à la suppression de GABARAPL1 pourrait contribuer aux phénotypes plus agressifs observés.

Afin d'étudier de manière plus approfondie le rôle de GABARAPL1 dans la mitophagie (Novak *et al.*, 2010), il serait nécessaire d'étudier l'effet de la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A dans la mitophagie et d'étudier l'effet de la mutation G116A sur l'interaction de GABARAPL1 avec l'adaptateur de la mitophagie, NIX. Ceci permettra ainsi de déterminer si la localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes est nécessaire à son rôle dans la mitophagie, de la même manière que nous avons pu le montrer pour l'autophagie sélective des agrégats ubiquitinylés.

V. PROTEINE ATG8, AUTOPHAGIE ET TUMORIGENESE

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle des membres de la famille ATG8 dans les phénotypes cancéreux *in vitro* et dans la progression tumorale *in vivo*. Néanmoins, aucune étude sur le rôle des membres de la famille ATG8 dans la tumorigenèse n'a été réalisée jusqu'à présent. Les travaux de la littérature concernant l'étude de l'implication de l'autophagie dans la tumorigenèse ont uniquement été réalisés après délétion des gènes de l'autophagie *ATG5* et *ATG7*. Nous avons donc voulu étudier le rôle des protéines de la famille GABARAP dans la transformation cellulaire induite par HRAS^{G12V} dans des modèles cellulaires de fibroblastes embryonnaires murins MEF. Au vu de la forte expression de GABARAP et de la faible expression de GABARAPL1 dans les cellules MEF_p (MEF primaire) et MEF_i (MEF immortalisé), nous avons décidé d'étudier les conséquences de l'inactivation de *GABARAP* et de la surexpression de GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A sur la transformation cellulaire. Nos résultats ont permis de montrer que l'inactivation de *GABARAP* perturbe la transformation par HRAS^{G12V} des cellules MEF_i. En effet, les différents phénotypes tumoraux caractéristiques d'une transformation par HRAS^{G12V} tels que l'augmentation de la prolifération cellulaire, de la croissance indépendante de l'ancrage, de la clonogénicité, de la migration et de l'activité des métalloprotéases sont fortement diminués dans la lignée MEF_t (MEF transformé) GABARAP^{-/-} par rapport à la lignée MEF_t WT. Pour renforcer les résultats obtenus *in vitro*, il serait également intéressant d'étudier l'effet de l'inactivation de *GABARAP* au cours de la transformation par HRAS^{G12V} et le développement tumoral *in vivo*. Pour cela, les modèles cellulaires MEF_t WT et MEF_t GABARAP^{-/-} mis en place lors de ce projet pourraient être injectés dans des souris *nude*. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de l'autophagie dans la transformation cellulaire par HRAS^{G12V}. En effet, il a été mis en évidence que l'inhibition de l'autophagie suite à des traitements chimiques ou à la délétion d'*ATG5* ou *ATG7* inhibe les phénotypes cancéreux *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* suggérant que l'autophagie est nécessaire à la transformation cellulaire par les oncoprotéines KRAS^{G12V} ou HRAS^{G12V} (Guo *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011c; Lock *et al.*, 2011).

Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle GABARAP pourrait perturber la transformation par HRAS^{G12V} par le biais de son rôle dans l'autophagie. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'effet de HRAS^{G12V} sur le flux autophagique de nos lignées MEF_i et MEF_t WT et GABARAP^{-/-}. L'effet de la transformation par HRAS^{G12V} sur l'autophagie est complexe puisque plusieurs études ont mis en évidence que cette

transformation peut, selon les voies de signalisation, conduire à une augmentation ou une diminution de l'autophagie. En effet, il a été mis en évidence que HRAS^{G12V} ou KRAS^{G12V} peut promouvoir l'autophagie *via* la voie Rac1/MKK7/JNK (Byun *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2011c). HRAS^{G12V} peut également induire l'autophagie *via* la voie Raf-1/MEK1/2/ERK (Elgandy *et al.*, 2011; Pattingre *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2011). Au contraire, il a été mis en évidence que HRAS^{G12V} peut inhiber l'autophagie en activant la voie PI3K/Akt/mTOR (Berry & Baehrecke, 2007; Furuta *et al.*, 2004). Il serait donc également intéressant d'étudier les voies moléculaires régulées dans nos différents modèles lors de la transformation par HRAS^{G12V} afin d'élucider le mécanisme d'action de GABARAP.

Au vu de ces données, nous avons ensuite étudié l'effet de l'immortalisation par l'antigène T de SV40 et de la transformation cellulaire par HRAS^{G12V} sur l'expression des marqueurs de l'autophagie dans nos modèles cellulaires MEF. Les résultats suggèrent que le taux protéique des marqueurs de l'autophagie tels que LC3, GABARAP et GABARAPL1 augmente au cours de l'immortalisation et de la transformation cellulaire. L'augmentation de ces marqueurs pourrait rendre compte de plusieurs mécanismes i) une augmentation du flux autophagique, ii) un blocage de la dégradation protéique par autophagie, iii) un blocage de la dégradation protéique par le protéasome ou iv) une augmentation de la transcription des gènes codant ces protéines. De plus, nos résultats montrent que l'augmentation du taux de protéine GABARAPL1 est associée à une augmentation au niveau transcriptionnel de *gabarapl1* au cours de la transformation cellulaire par HRAS^{G12V}. Une régulation transcriptionnelle lors de la transformation cellulaire a déjà été mise en évidence pour *BNIP3*, une protéine impliquée dans la mitophagie, dont l'expression transcriptionnelle est augmentée lors de la transformation cellulaire par HRAS^{G12V} (Wu *et al.*, 2011). HRAS^{G12V} induit également une augmentation au niveau transcriptionnel d'ARC (Apoptosis repressor with caspase recruitment domain) et stabilise la protéine ARC en empêchant sa polyubiquitinylation et ainsi sa dégradation par le protéasome (Wu *et al.*, 2010). Au vu de ces résultats, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'immortalisation et de la transformation cellulaire sur la dégradation de GABARAPL1 par le protéasome au sein de nos différents modèles. Des études complémentaires devront également être réalisées afin de vérifier si une régulation transcriptionnelle et/ou une perturbation de la dégradation protéique (protéasome/autophagie) pourraient rendre compte de l'augmentation du taux des autres marqueurs de l'autophagie tels que LC3 et GABARAP au cours de l'immortalisation et de la transformation.

La suite de ce projet a été d'étudier le rôle de GABARAPL1, un autre membre de la famille GABARAP, dans la tumorigenèse. Le faible taux de GABARAPL1 dans les cellules MEFi ainsi

que la disponibilité au laboratoire des vecteurs d'expression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A, nous a incité à établir des modèles cellulaires de surexpression de cette protéine. Au cours de la validation de ces modèles de surexpression, des problèmes ont été rencontrés lors de la détection des protéines GABARAPL1 endogène et exogène. Seul un traitement par le MG132, un inhibiteur du protéasome, a permis de mettre en évidence ces protéines, suggérant une forte dégradation de GABARAPL1 par le protéasome dans ces cellules. Ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs de notre laboratoire montrant que GABARAPL1 peut être dégradée par le protéasome dans les cellules MCF-7 (Seguin-Py *et al.*, 2012). Les lignées de surexpression MEFi GABARAPL1 et MEFi GABARAPL1 G116A ont été transfectées par HRAS^{G12V} et les clones cellulaires obtenus sont en cours de validation. Un processus de sélection et de validation des nouveaux clones pourra être réalisé par la suite et permettra ainsi d'étudier l'effet de la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A sur la transformation cellulaire induite par HRAS^{G12V} comme décrit dans ce rapport pour le modèle MEFt WT et GABARAP^{-/-}. L'utilisation du mutant GABARAPL1 G116A permettra d'étudier l'implication de la localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes dans son rôle potentiel au cours de la tumorigenèse.

Ce travail a permis de mieux comprendre le rôle des protéines de la famille GABARAP dans le cancer et plus précisément dans la transformation cellulaire induite par l'oncoprotéine HRAS^{G12V}. Nous avons également mis en évidence une perturbation de l'autophagie lors des processus d'immortalisation et de transformation cellulaire.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'analyser le lien entre autophagie et cancer *via* l'étude de deux protéines, QSOX1 et GABARAPL1. Les données obtenues ont permis de mettre en évidence un rôle de QSOX1 dans l'autophagie qui pourrait expliquer ses fonctions dans le cancer du sein. Mes travaux de thèse ont également permis de mieux caractériser le rôle de GABARAPL1 dans le métabolisme cellulaire, l'autophagie, la progression tumorale et la tumorigenèse.

VI. PERSPECTIVES A LONG TERME

Compte tenu de ces résultats, il existe plusieurs axes d'études pour les futurs projets qui se recentreront sur GABARAPL1 (l'étude de QSOX1 ayant été interrompue au sein de notre laboratoire) :

- Poursuivre l'étude du rôle de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A dans l'autophagie afin d'identifier les mécanismes moléculaires exacts impliqués. Il sera nécessaire de mieux comprendre comment GABARAPL1 agit aux niveaux des étapes précoces mais également des étapes tardives ? Comment peut-elle réguler la phosphorylation d'ULK1 et mTOR ? Comment peut-elle réguler l'acidification des lysosomes et leur fusion avec les autophagosomes ?
- Poursuivre l'étude de l'implication de GABARAPL1 dans l'autophagie sélective. Il sera intéressant de mieux comprendre comment GABARAPL1 peut réguler la mitophagie ? Il sera également judicieux d'étendre l'étude de l'implication de la localisation de GABARAPL1 aux autophagosomes dans ses fonctions liées à d'autres types d'autophagie sélective ? Il sera pour cela nécessaire d'étudier l'interaction de GABARAPL1 G116A avec différents adaptateurs tels que NIX, NBR1, STBD1.
- Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions de GABARAPL1 dans le cancer en étudiant par exemple la régulation de la voie WNT lors de la surexpression de GABARAPL1 ou GABARAPL1 G116A. En effet, il a été mis en évidence que GABARAPL1 régule négativement cette voie de signalisation impliquée dans le cancer (Zhang *et al.*, 2011).
- Etudier le rôle de GABARAPL1 dans d'autres étapes du développement tumoral tel que la TEM *in vitro* et *in vivo*. Il sera intéressant d'analyser l'effet de la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A ou de l'extinction de GABARAPL1 sur ce mécanisme. Par exemple, il sera judicieux d'étudier si l'expression de protéines impliquées dans la TEM est régulée lors de la surexpression ou de l'extinction de GABARAPL1.

L'étude comparative du protéome des cellules surexprimant GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A réalisée par spectrométrie de masse sera poursuivie et permettra également d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans les fonctions cellulaires de GABARAPL1 et plus particulièrement ceux impliqués dans l'autophagie. Cette étude nous permettra également d'identifier des voies moléculaires impliquées dans d'autres fonctions de GABARAPL1 connues ou non.

De plus, à plus long terme, une meilleure compréhension du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie et le cancer pourrait permettre l'utilisation de cette protéine comme biomarqueur chez les patients atteints de cancer. L'identification de nouveaux biomarqueurs étant un enjeu important pour tenter d'adapter aux mieux les traitements anti-cancéreux dans une approche théranostique.

BIBLIOGRAPHIE

- Adisheshaiah PP, Clogston JD, McLeland CB, Rodriguez J, Potter TM, Neun BW, Skoczen SL, Shanmugavelandy SS, Kester M, Stern ST, McNeil SE (2013) Synergistic combination therapy with nanoliposomal C6-ceramide and vinblastine is associated with autophagy dysfunction in hepatocarcinoma and colorectal cancer models. *Cancer Lett* **337**: 254-265
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**: 59-65
- Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, Thiery JP, Mami-Chouaib F, Chouaib S (2013) EMT impairs breast carcinoma cell susceptibility to CTL-mediated lysis through autophagy induction. *Autophagy* **9**: 1104-1106
- Alam J, Deharo D, Redding KM, Re RN, Cook JL (2010) C-terminal processing of GABARAP is not required for trafficking of the angiotensin II type 1A receptor. *Regul Pept* **159**: 78-86
- Albanesi J, Wang H, Sun HQ, Levine B, Yin H (2015) GABARAP-mediated targeting of PI4K2A/PI4KIIalpha to autophagosomes regulates PtdIns4P-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*: 0
- Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B (2006) Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther* **5**: 1183-1189
- Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Overvatn A, Kirkin V, Johansen T (2012) ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem* **287**: 39275-39290
- Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan KL, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB, Walker CL (2010) ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4153-4158
- Amaravadi RK (2012) Autophagy and tumor cell invasion. *Cell Cycle* **11**: 3718-3719
- Andre F, Berrada N, Desmedt C (2010) Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Curr Opin Oncol* **22**: 547-551
- Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Katchman BA, Decker GA, Ruiz Y, Sielaff TD, Koep LJ, Lake DF (2009) Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. *J Proteome Res* **8**: 4722-4731
- Aoki H, Kondo Y, Aldape K, Yamamoto A, Iwado E, Yokoyama T, Hollingsworth EF, Kobayashi R, Hess K, Shinojima N, Shingu T, Tamada Y, Zhang L, Conrad C, Bogler O, Mills G, Sawaya R, Kondo S (2008) Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Autophagy* **4**: 467-475
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Noguez C, Mira JP, Chompret A *et al* (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**: 1050-1059
- Aplin A, Jasionowski T, Tuttle DL, Lenk SE, Dunn WA, Jr. (1992) Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J Cell Physiol* **152**: 458-466

- Araujo DG, Nakao L, Gozzo P, Souza CD, Balderrama V, Gugelmin ES, Kuczynski AP, Olandoski M, de Noronha L (2014) Expression level of quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. *Eur J Histochem* **58**: 2228
- Ashford TP, Porter KR (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* **12**: 198-202
- Atlashkin V, Kreykenbohm V, Eskelinen EL, Wenzel D, Fayyazi A, Fischer von Mollard G (2003) Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol* **23**: 5198-5207
- Avalos Y, Canales J, Bravo-Sagua R, Criollo A, Lavandero S, Quest AF (2014) Tumor suppression and promotion by autophagy. *Biomed Res Int* **2014**: 603980
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**: 685-701
- B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A (2013) The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* **41**: 7683-7699
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* **28**: 5747-5763
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**: 2570-2581
- Benayoun B, Esnard-Feve A, Castella S, Courty Y, Esnard F (2001) Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. *J Biol Chem* **276**: 13830-13837
- Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH (2009) Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J* **28**: 3015-3026
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**: 107-120
- Berg TO, Fengsrud M, Stromhaug PE, Berg T, Seglen PO (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* **273**: 21883-21892
- Berry DL, Baehrecke EH (2007) Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* **131**: 1137-1148
- Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafrasse C, Tolle F, Fraichard A, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Descotes F (2010) High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* **102**: 1024-1031
- Betin VM, Lane JD (2009) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* **122**: 2554-2566

- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**: 603-614
- Bonucci G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP (2010) Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* **9**: 3506-3514
- Botti J, Djavaheri-Mergny M, Pilatte Y, Codogno P (2006) Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. *Autophagy* **2**: 67-73
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**: 1025-1040
- Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bole-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, Chakrama FZ, Fraichard A, Darley-Usmar VM, Despouy G, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Zhang J (2014) The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy* **10**: 986-1003
- Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J (2011) Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 67-72
- Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G (2013) Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* **59**: 583-594
- Brigger D, Torbett BE, Chen J, Fey MF, Tschan MP (2013) Inhibition of GATE-16 attenuates ATRA-induced neutrophil differentiation of APL cells and interferes with autophagosome formation. *Biochem Biophys Res Commun* **438**: 283-288
- Buchberger A, Bukau B, Sommer T (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell* **40**: 238-252
- Buchheit CL, Rayavarapu RR, Schafer ZT (2012) The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment. *Semin Cell Dev Biol* **23**: 402-411
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* **17**: 1595-1607
- Byun JY, Yoon CH, An S, Park IC, Kang CM, Kim MJ, Lee SJ (2009) The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras. *Carcinogenesis* **30**: 1880-1888
- Cao C, Subhawong T, Albert JM, Kim KW, Geng L, Sekhar KR, Gi YJ, Lu B (2006) Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Res* **66**: 10040-10047
- Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, Zhang H, Huang P, Mita AC, Mita MM, Giles FJ, Nawrocki ST (2010) Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* **14**: 2448-2459

- Castello-Cros R, Bonuccelli G, Molchansky A, Capozza F, Witkiewicz AK, Birbe RC, Howell A, Pestell RG, Whitaker-Menezes D, Sotgia F, Lisanti MP (2011) Matrix remodeling stimulates stromal autophagy, "fueling" cancer cell mitochondrial metabolism and metastasis. *Cell Cycle* **10**: 2021-2034
- Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, Faienza F, Esposito V, Limatola C, Cecconi F, Di Bartolomeo S (2015) Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol*
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M (2010) GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* **6**: 495-505
- Chakravarthi S, Jessop CE, Willer M, Stirling CJ, Bulleid NJ (2007) Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochem J* **404**: 403-411
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* **275**: 25130-25138
- Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY (2006) GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* **281**: 7983-7993
- Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY (2011) Effects of C-terminal modifications of GEC1 protein and gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor-associated protein (GABARAP), two microtubule-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* **286**: 15106-15115
- Chen Y, Chen C, Kotsikorou E, Lynch DL, Reggio PH, Liu-Chen LY (2009) GEC1-kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect. *J Biol Chem* **284**: 1673-1685
- Chen Y, Li X, Wu X, He C, Guo L, Zhang S, Xiao Y, Guo W, Tan B (2013) Autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 impact the efficacy of chemoradiation on esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* **209**: 562-567
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* **15**: 171-182
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA, Olsen RW (2007) C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* **27**: 6655-6663
- Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, Chu CT (2010) Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol* **190**: 533-539
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**: 382-385
- Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, Soo Kim S, Ha J (2001) The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 92-97
- Chun SY, Johnson C, Washburn JG, Cruz-Correa MR, Dang DT, Dang LH (2010) Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1alpha and HIF-2alpha target genes. *Mol Cancer* **9**: 293
- Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, Salazar M, Quondamatteo F, Gherardini PF, De Zio D, Nazio F, Antonioli M, D'Orazio M, Skobo T, Bordi M, Rohde M, Dalla Valle L, Helmer-Citterich M, Gretzmeier

- C, Dengjel J, Fimia GM, Piacentini M, Di Bartolomeo S *et al* (2015) AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat Cell Biol* **17**: 20-30
- Cicchini M, Chakrabarti R, Kongara S, Price S, Nahar R, Lozy F, Zhong H, Vazquez A, Kang Y, Karantza V (2014) Autophagy regulator BECN1 suppresses mammary tumorigenesis driven by WNT1 activation and following parity. *Autophagy* **10**: 2036-2052
- Clark SL, Jr. (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* **3**: 349-362
- Colecchia D, Strambi A, Sanzone S, Iavarone C, Rossi M, Dall'Armi C, Piccioni F, Verrotti di Pianella A, Chiariello M (2012) MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy* **8**: 1724-1740
- Cook JL, Re RN, deHaro DL, Abadie JM, Peters M, Alam J (2008) The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **102**: 1539-1547
- Coppock D, Kopman C, Gudas J, Cina-Poppe DA (2000) Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 604-610
- Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S (1993) Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ* **4**: 483-493
- Cornu M, Albert V, Hall MN (2013) mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **23**: 53-62
- Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK (2013) Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* **339**: 286-291
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB (2002) Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33**: 63-74
- Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**: 121-134
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* **107**: 526-545
- Cuervo AM (2004) Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* **263**: 55-72
- Cuervo AM, Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**: 501-503
- Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cuyas E, Lopez-Bonet E, Martin-Castillo B, Joven J, Menendez JA (2013) The anti-malarial chloroquine overcomes primary resistance and restores sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep* **3**: 2469
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **6**: 184-192
- de Duve C (2005) The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* **7**: 847-849

- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* **60**: 604-617
- De Duve C, Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**: 435-492
- Debnath J (2008) Detachment-induced autophagy during anoikis and lumen formation in epithelial acini. *Autophagy* **4**: 351-353
- Debnath J (2011) The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**: 173-187
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**: 51-64
- DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM (2008) Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **27**: 11-18
- Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, Harding HP, Ron D (2004) Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **24**: 10161-10168
- Deng Q, Wang Z, Wang L, Zhang L, Xiang X, Chong T (2013) Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* **43**: 1261-1268
- Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **13**: 722-737
- Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, D'Amelio M, Nardacci R, Romagnoli A, Piacentini M, Cecconi F, Fimia GM (2010) The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* **191**: 155-168
- Dice JF (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* **15**: 305-309
- Ding WX, Ni HM, Gao W, Chen X, Kang JH, Stolz DB, Liu J, Yin XM (2009) Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy. *Mol Cancer Ther* **8**: 2036-2045
- Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW, 2nd, Yin XM (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* **285**: 27879-27890
- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G, Codogno P (2006) NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* **281**: 30373-30382
- Dorsey FC, Rose KL, Coenen S, Prater SM, Cavett V, Cleveland JL, Caldwell-Busby J (2009) Mapping the phosphorylation sites of Ulk1. *J Proteome Res* **8**: 5253-5263
- Dunlop EA, Hunt DK, Acosta-Jaquez HA, Fingar DC, Tee AR (2011) ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy* **7**: 737-747

- Dunn WA, Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**: 1935-1945
- Dupere-Richer D, Kinal M, Menasche V, Nielsen TH, Del Rincon S, Pettersson F, Miller WH, Jr. (2013) Vorinostat-induced autophagy switches from a death-promoting to a cytoprotective signal to drive acquired resistance. *Cell Death Dis* **4**: e486
- Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *EMBO J* **30**: 4701-4711
- Efeyan A, Sabatini DM (2010) mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 169-176
- Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL (2011a) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**: 643-644
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011b) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**: 456-461
- Elgendy M, Ciro M, Abdel-Aziz AK, Belmonte G, Dal Zuffo R, Mercurio C, Miracco C, Lanfrancone L, Foiani M, Minucci S (2014) Beclin 1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner. *Nat Commun* **5**: 5637
- Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ (2011) Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* **42**: 23-35
- Eng CH, Abraham RT (2011) The autophagy conundrum in cancer: influence of tumorigenic metabolic reprogramming. *Oncogene* **30**: 4687-4696
- Eskelinen EL (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**: 1-10
- Eskelinen EL, Saftig P (2009) Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 664-673
- Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, Salvador N, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, Heeren J, von Figura K, Knecht E, Saftig P (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* **15**: 3132-3145
- Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI (2009) TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1901-1916
- Farre JC, Krick R, Subramani S, Thumm M (2009) Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 522-530
- Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z (2006) Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem* **281**: 36303-36316
- Feng D, Liu L, Zhu Y, Chen Q (2013) Molecular signaling toward mitophagy and its physiological significance. *Exp Cell Res* **319**: 1697-1705

- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8204-8209
- Ferron M, Settembre C, Shimazu J, Lacombe J, Kato S, Rawlings DJ, Ballabio A, Karsenty G (2013) A RANKL-PKC β -TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts. *Genes Dev* **27**: 955-969
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* **179**: 485-500
- Filomeni G, De Zio D, Cecconi F (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* **22**: 377-388
- Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR (2010) Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy* **6**: 999-1005
- Forgac M (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 917-929
- Frake RA, Ricketts T, Menzies FM, Rubinsztein DC (2015) Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest* **125**: 65-74
- Fruehauf JP, Meyskens FL, Jr. (2007) Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* **13**: 789-794
- Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A (2008) Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* **99**: 1813-1819
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T (2008a) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* **19**: 4651-4659
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008b) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* **19**: 2092-2100
- Fulda S, Kogel D (2015) Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* **20**: 355-362
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J (2008) Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **19**: 797-806
- Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T (2004) Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* **23**: 3898-3904
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A *et al* (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* **34**: 856-880

- Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G (2008) To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med* **8**: 78-91
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **284**: 12297-12305
- Gao W, Kang JH, Liao Y, Ding WX, Gambotto AA, Watkins SC, Liu YJ, Stolz DB, Yin XM (2010) Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *J Biol Chem* **285**: 1371-1383
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* **19**: 4861-4870
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**: 119-131
- Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**: 859-864
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P (2010) Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* **70**: 6945-6956
- Goetz ME, Luch A (2008) Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett* **266**: 73-83
- Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, Zhu Y, Domergue V, Marin-Esteban V, Tharinger H, Delbos L, Gary-Gouy H, Morel AP, Ghavami S, Song E, Codogno P, Mehrpour M (2013) Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* **32**: 2261-2272, 2272e 2261-2211
- Gottschling S, Granzow M, Kuner R, Jauch A, Herpel E, Xu EC, Muley T, Schnabel PA, Herth FJ, Meister M (2013) Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer--different from others? Insights from comparative molecular and functional analyses. *Lung Cancer* **80**: 19-29
- Gough DR, Cotter TG (2011) Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* **2**: e213
- Gozuacik D, Kimchi A (2006) DAPk protein family and cancer. *Autophagy* **2**: 74-79
- Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, Bertaggia E, Blaauw B, Urciuolo A, Tiepolo T, Merlini L, Maraldi NM, Bernardi P, Sandri M, Bonaldo P (2010) Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med* **16**: 1313-1320
- Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA (2011) Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* **124**: 3189-3197
- Guo GF, Jiang WQ, Zhang B, Cai YC, Xu RH, Chen XX, Wang F, Xia LP (2011a) Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **17**: 4779-4786

- Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, Collier HA, D'Paola RS, Gelinias C, Rabinowitz JD, White E (2011b) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* **25**: 460-470
- Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, Chen G, Price S, Lu W, Teng X, Snyder E, Santanam U, D'Paola RS, Jacks T, Rabinowitz JD, White E (2013) Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev* **27**: 1447-1461
- Gutierrez MG, Munafò DB, Beron W, Colombo MI (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* **117**: 2687-2697
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**: 214-226
- Haigis MC, Sinclair DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* **5**: 253-295
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* **282**: 37298-37302
- Hao CL, Li Y, Yang HX, Luo RZ, Zhang Y, Zhang MF, Cheng YF, Wang X (2014) High level of microtubule-associated protein light chain 3 predicts poor prognosis in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **7**: 4213-4221
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* **181**: 497-510
- Hashimoto Y, Suga Y, Matsuba S, Mizoguchi M, Takamori K, Seitz J, Ogawa H (2000) Immunohistochemical localization of sulfhydryl oxidase correlates with disulfide crosslinking in the upper epidermis of rat skin. *Arch Dermatol Res* **292**: 570-572
- Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* **2**: 28
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **2**: 9-19
- He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, Pei Y, Chen Y, Ling W, Wu C, Zhao S, Liu JO, Yu L (2003) Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* **278**: 29278-29287
- He JH, Luo RZ, Cai MY, Li M, Lu JB, Yuan ZY (2013) Decreased expression of light chain 3 (LC3) increased the risk of distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* **30**: 468
- Heckler EJ, Rancy PC, Kodali VK, Thorpe C (2008) Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 567-577
- Hellebrekers DM, Melotte V, Vire E, Langenkamp E, Molema G, Fuks F, Herman JG, Van Criekinge W, Griffioen AW, van Engeland M (2007) Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Res* **67**: 4138-4148

- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 89-102
- Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, Martinez G, Cuervo AM, Brown RH, Glimcher LH (2009) XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev* **23**: 2294-2306
- Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Jr., Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, Darley-Usmar VM (2012) Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem* **393**: 1485-1512
- Hoover KL, Joneja B, White HB, 3rd, Thorpe C (1996) A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem* **271**: 30510-30516
- Hoover KL, Sheasley SL, Gilbert HF, Thorpe C (1999) Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. *J Biol Chem* **274**: 22147-22150
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009a) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20**: 1981-1991
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N (2009b) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**: 973-979
- Hoyvik H, Gordon PB, Berg TO, Stromhaug PE, Seglen PO (1991) Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *J Cell Biol* **113**: 1305-1312
- Hu YL, Jahangiri A, Delay M, Aghi MK (2012) Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. *Cancer Res* **72**: 4294-4299
- Huang J, Manning BD (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* **37**: 217-222
- Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, Liu B, Chang C, Zhou T, Lippincott-Schwartz J, Liu W (2015) Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell* **57**: 456-466
- Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* **280**: 29060-29066
- Iannello A, Raulet DH (2013) Immune surveillance of unhealthy cells by natural killer cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **78**: 249-257
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488-492
- Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M (2008) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem* **283**: 22847-22857
- Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka

- K, Yamamoto M, Komatsu M (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell* **51**: 618-631
- Ilani T, Alon A, Grossman I, Horowitz B, Kartvelishvily E, Cohen SR, Fass D (2013) A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. *Science* **341**: 74-76
- Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K, Komatsu M (2011) Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* **193**: 275-284
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577-590
- Iozzo RV (2011) Autophagic tumor stroma: a biofuel for cancer growth. *Cell Cycle* **10**: 3231-3232
- Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**: 4837-4848
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**: 574-587
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**: 277-300
- Jiang H, Cheng D, Liu W, Peng J, Feng J (2010a) Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochem Biophys Res Commun* **395**: 471-476
- Jiang R, Cabras G, Sheng W, Zeng Y, Ooka T (2009) Synergism of BAF1 with Ras induces malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia* **11**: 964-973
- Jiang S, Heller B, Tagliabracci VS, Zhai L, Irimia JM, DePaoli-Roach AA, Wells CD, Skurat AV, Roach PJ (2010b) Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem* **285**: 34960-34971
- Jiang S, Wells CD, Roach PJ (2011) Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAP1. *Biochem Biophys Res Commun* **413**: 420-425
- Jiang ZF, Shao LJ, Wang WM, Yan XB, Liu RY (2012) Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* **39**: 259-267
- Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* **191**: 933-942
- Josset E, Burckel H, Noel G, Bischoff P (2013) The mTOR inhibitor RAD001 potentiates autophagic cell death induced by temozolomide in a glioblastoma cell line. *Anticancer Res* **33**: 1845-1851
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **20**: 1992-2003
- Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH (2011) ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* **7**: 1212-1221

- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* **19**: 5720-5728
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**: 2805-2812
- Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 392-401
- Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y (2003) Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* **26**: 931-935
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* **11**: 448-457
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I (2003) Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* **63**: 2103-2108
- Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S (2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* **24**: 980-991
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **21**: 1621-1635
- Karnoub AE, Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 517-531
- Karpathiou G, Sivridis E, Koukourakis MI, Mikroulis D, Bouros D, Froudarakis ME, Giatromanolaki A (2011) Light-chain 3A autophagic activity and prognostic significance in non-small cell lung carcinomas. *Chest* **140**: 127-134
- Katchman BA, Antwi K, Hostetter G, Demeure MJ, Watanabe A, Decker GA, Miller LJ, Von Hoff DD, Lake DF (2011) Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. *Mol Cancer Res* **9**: 1621-1631
- Katchman BA, Ocal IT, Cunliffe HE, Chang YH, Hostetter G, Watanabe A, LoBello J, Lake DF (2013) Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. *Breast Cancer Res* **15**: R28
- Kenific CM, Debnath J (2015) Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends Cell Biol* **25**: 37-45
- Kenific CM, Thorburn A, Debnath J (2010) Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 241-245
- Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* **10**: 935-945
- Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Ryu KW, Bae JM, Kim S (2003) Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* **39**: 184-191

- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011a) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**: 132-141
- Kim JH, Kim HY, Lee YK, Yoon YS, Xu WG, Yoon JK, Choi SE, Ko YG, Kim MJ, Lee SJ, Wang HJ, Yoon G (2011b) Involvement of mitophagy in oncogenic K-Ras-induced transformation: overcoming a cellular energy deficit from glucose deficiency. *Autophagy* **7**: 1187-1198
- Kim MJ, Woo SJ, Yoon CH, Lee JS, An S, Choi YH, Hwang SG, Yoon G, Lee SJ (2011c) Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J Biol Chem* **286**: 12924-12932
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**: 109-122
- Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I (2009a) NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* **5**: 732-733
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Overvatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T (2009b) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**: 505-516
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**: 605-608
- 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
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J *et al* (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**: 445-544
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT *et al* (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**: 151-175
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-545
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**: 1717-1721
- Knaevelsrud H, Simonsen A (2010) Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. *FEBS Lett* **584**: 2635-2645
- Knight D, Harris R, McAlister MS, Phelan JP, Geddes S, Moss SJ, Driscoll PC, Keep NH (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**: 5556-5561

- Kochl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA (2006) Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* **7**: 129-145
- Kodali VK, Thorpe C (2010) Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. *Antioxid Redox Signal* **13**: 1217-1230
- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* **12**: 213-223
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A *et al* (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**: 1149-1163
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**: 425-434
- Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T (2007) ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* **14**: 230-239
- Kraft C, Kijanska M, Kalie E, Siergiejuk E, Lee SS, Semplicio G, Stoffel I, Brezovich A, Verma M, Hansmann I, Ammerer G, Hofmann K, Tooze S, Peter M (2012) Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J* **31**: 3691-3703
- Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**: 280-293
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**: 18619-18625
- Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D (2010) Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest* **120**: 1043-1055
- Kunz JB, Schwarz H, Mayer A (2004) Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem* **279**: 9987-9996
- Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar MH, Fukumoto M, Shimura T, Ohtake Y, Ohkubo Y, Mori S, Uchiyama Y (2011) Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death Dis* **2**: e177
- Lamark T, Kirkin V, Dikic I, Johansen T (2009) NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* **8**: 1986-1990
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 178-196

- Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y (2008) SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **283**: 27628-27635
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274-293
- Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD (2010) A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* **30**: 3275-3285
- Lazova R, Camp RL, Klump V, Siddiqui SF, Amaravadi RK, Pawelek JM (2012) Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin Cancer Res* **18**: 370-379
- Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M (2011a) GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy* **7**: 1098-1107
- Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Risold PY, Boyer-Guittaut M (2011b) GABARAPL1 antibodies: target one protein, get one free! *Autophagy* **7**: 1302-1307
- Lee DY, Arnott D, Brown EJ (2013a) Ubiquilin4 is an adaptor protein that recruits Ubiquilin1 to the autophagy machinery. *EMBO Rep* **14**: 373-381
- Lee H, Noh JY, Oh Y, Kim Y, Chang JW, Chung CW, Lee ST, Kim M, Ryu H, Jung YK (2012) IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Hum Mol Genet* **21**: 101-114
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3374-3379
- Lee IH, Finkel T (2009) Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J Biol Chem* **284**: 6322-6328
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* **17**: 1561-1567
- Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG (2010a) The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* **5**: e15394
- Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP (2010b) Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* **189**: 671-679
- Lee YJ, Hah YJ, Kang YN, Kang KJ, Hwang JS, Chung WJ, Cho KB, Park KS, Kim ES, Seo HY, Kim MK, Park KG, Jang BK (2013b) The autophagy-related marker LC3 can predict prognosis in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **8**: e81540
- Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel AM, Bourachot B, Zago G, Bieche I, Dubois T, Meseure D, Vincent-Salomon A, Camonis J, Mechta-Grigoriou F (2014) Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy* **10**: 2122-2142
- Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2432-2437

- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27-42
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**: 323-335
- Levonen AL, Hill BG, Kansanen E, Zhang J, Darley-USmar VM (2014) Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. *Free Radic Biol Med* **71**: 196-207
- Levy JM, Thorburn A (2011) Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol Ther* **131**: 130-141
- Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H (2009) Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol* **16**: 761-771
- Li J, Yang B, Zhou Q, Wu Y, Shang D, Guo Y, Song Z, Zheng Q, Xiong J (2013) Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis* **34**: 1343-1351
- Li WW, Li J, Bao JK (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* **69**: 1125-1136
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* **8**: 688-699
- Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, Jung JU (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* **10**: 776-787
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676
- Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabasi AL, Vidal M, Zoghbi HY (2006) A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* **125**: 801-814
- Lim J, Kim HW, Youdim MB, Rhyu IJ, Choe KM, Oh YJ (2011) Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy* **7**: 51-60
- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* **136**: 61-70
- Lipinski MM, Hoffman G, Ng A, Zhou W, Py BF, Hsu E, Liu X, Eisenberg J, Liu J, Blenis J, Xavier RJ, Yuan J (2010a) A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Dev Cell* **18**: 1041-1052
- Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, Xavier RJ, Li C, Yankner BA, Scherzer CR, Yuan J (2010b) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14164-14169
- Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Chiavarina B, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Tsirigos A, Witkiewicz A, Lin Z, Balliet R, Howell A, Sotgia F (2010) Understanding the "lethal" drivers of tumor-stroma co-evolution: emerging role(s) for hypoxia, oxidative stress and autophagy/mitophagy in the tumor micro-environment. *Cancer Biol Ther* **10**: 537-542

- Liu C, Xia Y, Jiang W, Liu Y, Yu L (2014) Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* **31**: 2043-2048
- Liu C, Xu P, Chen D, Fan X, Xu Y, Li M, Yang X, Wang C (2013a) Roles of autophagy-related genes Beclin-1 and LC3 in the development and progression of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Biomed Rep* **1**: 855-860
- Liu D, Yang Y, Liu Q, Wang J (2011) Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol* **28**: 105-111
- Liu H, He Z, von Rutte T, Yousefi S, Hunger RE, Simon HU (2013b) Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. *Sci Transl Med* **5**: 202ra123
- Liu KP, Zhou D, Ouyang DY, Xu LH, Wang Y, Wang LX, Pan H, He XH (2013c) LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **441**: 970-975
- Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC (2008) Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *J Biol Chem* **283**: 31153-31162
- Liu YL, Yang PM, Shun CT, Wu MS, Weng JR, Chen CC (2010) Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* **6**: 1057-1065
- Lo WL, Chu PY, Lee TH, Su TL, Chien Y, Chen YW, Huang PI, Tseng LM, Tu PH, Kao SY, Lo JF (2012) A Combined DNA-Affinic Molecule and N-Mustard Alkylating Agent Has an Anti-Cancer Effect and Induces Autophagy in Oral Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **13**: 3277-3290
- Lock R, Debnath J (2008) Extracellular matrix regulation of autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 583-588
- Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM, Debnath J (2011) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* **22**: 165-178
- Loffler AS, Alers S, Dieterle AM, Keppeler H, Franz-Wachtel M, Kundu M, Campbell DG, Wesselborg S, Alessi DR, Stork B (2011) Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy* **7**: 696-706
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J (2005a) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* **15**: 702-713
- Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J (2005b) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem* **280**: 23433-23436
- Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS, Bast RC, Jr. (2008) The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* **118**: 3917-3929
- Lubke T, Lobel P, Sleat DE (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 625-635
- Luciani A, Villella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, Gavina M, Pulze L, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, D'Apolito M, Guido S, Masliah E, Spencer B, Quarantino S, Raia V, Ballabio A, Maiuri L (2010) Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* **12**: 863-875

- Lucocq J, Walker D (1997) Evidence for fusion between multilamellar endosomes and autophagosomes in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **72**: 307-313
- Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, Vogel P, Milasta S, Martinez J, Huang G, Green M, Kundu M, Chi H, Xavier RJ, Green DR, Lamkanfi M, Dinarello CA, Doherty PC, Kanneganti TD (2013) Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol* **14**: 480-488
- Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR (2003) Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* **20**: 141-154
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 622-632
- Lv Q, Wang W, Xue J, Hua F, Mu R, Lin H, Yan J, Lv X, Chen X, Hu ZW (2012) DEDD interacts with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer. *Cancer Res* **72**: 3238-3250
- Lystad AH, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, Simonsen A (2014) Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* **15**: 557-565
- Ma Q (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 401-426
- Ma X, Godar RJ, Liu H, Diwan A (2012) Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death. *Autophagy* **8**: 297-309
- Ma XH, Piao S, Wang D, McAfee QW, Nathanson KL, Lum JJ, Li LZ, Amaravadi RK (2011) Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* **17**: 3478-3489
- Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G (2013) Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* **39**: 211-227
- Mack HI, Zheng B, Asara JM, Thomas SM (2012) AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 regulates ATG9 localization. *Autophagy* **8**: 1197-1214
- Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Pous C (2013) Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci* **126**: 1071-1080
- Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL (2012) Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* **196**: 407-417
- Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P (2013) Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* **19**: 428-446
- Mairet-Coello G, Tury A, Esnard-Fève A, Fellmann D, Risold PY, Griffond B (2004) FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* **473**: 334-363
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* **26**: 2527-2539

- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006) mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* **25**: 6416-6422
- Mann SS, Hammarback JA (1994) Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* **269**: 11492-11497
- Mansuy-Schlick V, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Boireau W (2006) Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements. *Biosens Bioelectron* **21**: 1830-1837
- 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
- Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C (2007) Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* **282**: 18573-18583
- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**: 361-370
- Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R (2012) MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**: 903-914
- Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira DB, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Lin Z, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Knudsen ES, Sotgia F, Lisanti MP (2010a) Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle* **9**: 3256-3276
- Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, Lisanti MP (2011a) Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 1045-1051
- Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, Wang C, Pavlides S, Martinez-Cantarín MP, Capozza F, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Caro J, Lisanti MP, Sotgia F (2010b) Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkappaB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* **9**: 3515-3533
- Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Lisanti MP, Sotgia F (2011b) Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator. *Cell Cycle* **10**: 1784-1793
- Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Chiavarina B, Bonuccelli G, Casey T, Tsigos A, Migneco G, Witkiewicz A, Balliet R, Mercier I, Wang C, Flomenberg N, Howell A, Lin Z, Caro J, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP (2010c) The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth": A simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle* **9**: 4297-4306
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2007a) Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 961-967
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**: 1062-1075

- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E (2007b) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* **21**: 1367-1381
- Matsuba S, Suga Y, Ishidoh K, Hashimoto Y, Takamori K, Kominami E, Wilhelm B, Seitz J, Ogawa H (2002) Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *J Dermatol Sci* **30**: 50-62
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* **189**: 211-221
- Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, Akira S, Noda T, Yoshimori T (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**: 385-396
- Maycotte P, Thorburn A (2011) Autophagy and cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **11**: 127-137
- Mazure NM, Pouyssegur J (2010) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol* **22**: 177-180
- McEwan DG, Dikic I (2015) PLEKHM1: Adapting to life at the lysosome. *Autophagy* **11**: 720-722
- McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, Coxon FP, Miranda de Stegmann D, Bhogaraju S, Maddi K, Kirchof A, Gatti E, Helfrich MH, Wakatsuki S, Behrends C, Pierre P, Dikic I (2015) PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell* **57**: 39-54
- Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, Selkoe DJ, Lemberg MK (2011) The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J Neurochem* **117**: 856-867
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**: 649-662
- Metlagel Z, Otomo C, Ohashi K, Takaesu G, Otomo T (2014) Structural insights into E2-E3 interaction for LC3 lipidation. *Autophagy* **10**: 522-523
- Miao Y, Zhang Y, Chen Y, Chen L, Wang F (2010) GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatogastroenterology* **57**: 257-261
- Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, Harris AL (2009) The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res* **69**: 4415-4423
- Mindell JA (2012) Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol* **74**: 69-86
- Miracco C, Cevenini G, Franchi A, Luzi P, Cosci E, Mourmouras V, Monciatti I, Mannucci S, Biagioli M, Toscano M, Moretti D, Lio R, Massi D (2010) Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions. *Hum Pathol* **41**: 503-512
- Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V, Falzarano SM, Pirtoli L, Tosi P (2007) Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* **30**: 429-436

- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**: 1679-1688
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-1075
- Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* **18**: 3888-3896
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**: 395-398
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiya T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**: 657-668
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**: 1101-1111
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2002) Mouse Apg10 as an Apg12-conjugating enzyme: analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett* **532**: 450-454
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 107-132
- Momcilovic M, Hong SP, Carlson M (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* **281**: 25336-25343
- Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F (2009) Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc* **84**: 431-448
- Morel C, Adami P, Musard JF, Duval D, Radom J, Jouvenot M (2007) Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **313**: 3971-3982
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Marino G, Michaud M, Vitale I, Maiuri MC, Kroemer G (2011) Oncosuppressive functions of autophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**: 2251-2269
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G (2009) Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1524-1532
- Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Criollo A, Galluzzi L, Malik SA, Vitale I, Michaud M, Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G (2010) Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis* **1**: e10
- Muller O, Sattler T, Flotenmeyer M, Schwarz H, Plattner H, Mayer A (2000) Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J Cell Biol* **151**: 519-528
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13

- Musard JF, Sallot M, Dulieu P, Fraichard A, Ordener C, Remy-Martin JP, Jouvenot M, Adami P (2001) Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 83-91
- Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT (2013) Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy* **9**: 1407-1417
- N'Diaye EN, Debnath J, Brown EJ (2009a) Ubiquilins accelerate autophagosome maturation and promote cell survival during nutrient starvation. *Autophagy* **5**: 573-575
- N'Diaye EN, Kajihara KK, Hsieh I, Morisaki H, Debnath J, Brown EJ (2009b) PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep* **10**: 173-179
- Nagelkerke A, Bussink J, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Span PN (2015) Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: pharmacological modulation of treatment-induced autophagy. *Semin Cancer Biol* **31**: 99-105
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* **12**: 222-230
- Nam HY, Han MW, Chang HW, Lee YS, Lee M, Lee HJ, Lee BW, Lee KE, Jung MK, Jeon H, Choi SH, Park NH, Kim SY, Kim SW (2013) Radioresistant cancer cells can be conditioned to enter senescence by mTOR inhibition. *Cancer Res* **73**: 4267-4277
- Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ (2010) p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* **6**: 1090-1106
- Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R (2003) Expression of *gec1*/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: predominance of *gec1*/GABARAPL1 in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **119**: 216-219
- Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, Minematsu-Ikeguchi N, Yokota M, Ohsumi M, Ueno T, Kominami E (2003) The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem* **278**: 39517-39526
- Neufeld TP (2010) TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 157-168
- Nitta T, Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Hirano S, Nakanuma Y (2014) Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **7**: 4913-4921
- Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, Ishii J, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F (2008) Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells* **13**: 1211-1218
- Novak I (2012) Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. *Antioxid Redox Signal* **17**: 794-802

- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**: 45-51
- Novikoff AB (1959) The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *J Biophys Biochem Cytol* **6**: 136-138
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**: 9220-9231
- Ohkuma S, Moriyama Y, Takano T (1982) Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc Natl Acad Sci US A* **79**: 2758-2762
- Ohsumi Y (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 211-216
- Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou YS, Kimura M, Sato S, Hattori N, Komatsu M, Tanaka K, Matsuda N (2010) p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* **15**: 887-900
- Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, Tooze SA (2012) Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* **23**: 1860-1873
- Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Lampen N, Yahalom J (2005) Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res* **65**: 11061-11070
- Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A (2011) Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet* **20**: 3852-3866
- Panda PK, Mukhopadhyay S, Das DN, Sinha N, Naik PP, Bhutia SK (2015) Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol* **39**: 43-55
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**: 24131-24145
- Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 3481-3498
- Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC (2008) Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ* **15**: 1572-1581
- Park JM, Huang S, Wu TT, Foster NR, Sinicrope FA (2013) Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. *Cancer Biol Ther* **14**: 100-107
- Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**: 460-473

- Pattingre S, Bauvy C, Codogno P (2003) Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* **278**: 16667-16674
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**: 927-939
- Pavlidis S, Tsirigos A, Migneco G, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Flomenberg N, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2010) The autophagic tumor stroma model of cancer: Role of oxidative stress and ketone production in fueling tumor cell metabolism. *Cell Cycle* **9**: 3485-3505
- Pavlidis S, Vera I, Gandara R, Sneddon S, Pestell RG, Mercier I, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2012) Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis. *Antioxid Redox Signal* **16**: 1264-1284
- Paz Y, Elazar Z, Fass D (2000) Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem* **275**: 25445-25450
- Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL (1993) Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* **90**: R17-21
- Peng YF, Shi YH, Ding ZB, Ke AW, Gu CY, Hui B, Zhou J, Qiu SJ, Dai Z, Fan J (2013) Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy* **9**: 2056-2068
- Perez-Perez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL, Lemaire SD (2014) The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* **10**: 1953-1964
- Pernodet N, Hermetet F, Adami P, Vejux A, Descotes F, Borg C, Adams M, Pallandre JR, Viennet G, Esnard F, Jouvenot M, Despouy G (2012) High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **14**: R136
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* **118**: 2190-2199
- Pietras K, Ostman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* **316**: 1324-1331
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E (2004) Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* **11**: 1163-1182
- Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**: 506-522
- Puissant A, Fenouille N, Auberger P (2012) When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res* **2**: 397-413

- Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM (2008) Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat* **112**: 389-403
- Qiang L, He YY (2014) Autophagy deficiency stabilizes TWIST1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *Autophagy* **10**: 1864-1865
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**: 1809-1820
- Rabinowitz JD, White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science* **330**: 1344-1348
- Radom J, Colin D, Thiebault F, Dognin-Bergeret M, Mairet-Coello G, Esnard-Feve A, Fellmann D, Jouvenot M (2006) Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 225-233
- Rao S, Tortola L, Perlot T, Wirnsberger G, Novatchkova M, Nitsch R, Sykacek P, Frank L, Schramek D, Komnenovic V, Sigl V, Aumayr K, Schmauss G, Fellner N, Handschuh S, Glosmann M, Pasierbek P, Schleiderer M, Resch GP, Ma Y *et al* (2014) A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun* **5**: 3056
- Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, Imarisio S, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Brown SD, Rubinsztein DC (2005) Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* **37**: 771-776
- Rho SB, Byun HJ, Kim BR, Kim IS, Lee JH, Yoo R, Park ST, Park SH (2013) GABAA receptor-binding protein promotes sensitivity to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Int J Oncol* **42**: 1807-1814
- Roberts SS, Mendonca-Torres MC, Jensen K, Francis GL, Vasko V (2009) GABA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Pathol Oncol Res* **15**: 645-650
- Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, Hsieh YC, Turner MA, Wang Z, Tian Q, Rodland MJ, Reynolds CP, Seeger RC, Nagalla SR (2004) GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **22**: 4127-4134
- Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 519-529
- Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, Au A, Rai TS, Zheng L, Ridgway R, Adams PD, Anderson KI, Gottlieb E, Sansom OJ, Ryan KM (2013) p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* **504**: 296-300
- Rothenberg C, Srinivasan D, Mah L, Kaushik S, Peterhoff CM, Ugolino J, Fang S, Cuervo AM, Nixon RA, Monteiro MJ (2010) Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Hum Mol Genet* **19**: 3219-3232
- Rouschop KM, Ramaekers CH, Schaaf MB, Keulers TG, Savelkouls KG, Lambin P, Koritzinsky M, Wouters BG (2009) Autophagy is required during cycling hypoxia to lower production of reactive oxygen species. *Radiother Oncol* **92**: 411-416
- Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkouls K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG (2010) The

- unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* **120**: 127-141
- Roze E, Bonnet C, Betuing S, Caboche J (2010) Huntington's disease. *Adv Exp Med Biol* **685**: 45-63
- Rozenknop A, Rogov VV, Rogova NY, Lohr F, Guntert P, Dikic I, Dotsch V (2011) Characterization of the interaction of GABARAPL-1 with the LIR motif of NBR1. *J Mol Biol* **410**: 477-487
- Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E751-760
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* **15**: 741-750
- Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D, Stenmark H (2007) ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* **17**: 1817-1825
- Rutkowski DT, Hegde RS (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* **189**: 783-794
- Saftig P, Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 623-635
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* **456**: 264-268
- Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu GY, Maeda S, Hardiman G, Karin M (2008) Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* **14**: 156-165
- Sakurai T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Omoto I, Owaki T, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S (2013) The expression of LC-3 is related to tumor suppression through angiogenesis in esophageal cancer. *Med Oncol* **30**: 701
- Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vazquez P, Blazquez C, Torres S, Garcia S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, Gonzalez-Feria L, Iovanna JL, Guzman M, Boya P, Velasco G (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* **119**: 1359-1372
- Samaddar JS, Gaddy VT, Duplantier J, Thandavan SP, Shah M, Smith MJ, Browning D, Rawson J, Smith SB, Barrett JT, Schoenlein PV (2008) A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol Cancer Ther* **7**: 2977-2987
- Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**: 290-303
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**: 1496-1501

- Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**: 232-235
- Sardiello M, Ballabio A (2009) Lysosomal enhancement: a CLEAR answer to cellular degradative needs. *Cell Cycle* **8**: 4021-4022
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**: 473-477
- Schafranek L, Leclercq TM, White DL, Hughes TP (2013) Clarithromycin enhances dasatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia cells, by inhibition of late stage autophagy. *Leuk Lymphoma* **54**: 198-201
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**: 1749-1760
- Schwartz RA, Fernandez G, Kotulska K, Jozwiak S (2007) Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. *J Am Acad Dermatol* **57**: 189-202
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, Kundu M, Opferman JT, Cleveland JL, Miller JL, Ney PA (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19500-19505
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* **7**: 167-178
- Seguin-Py S, Lucchi G, Croizier S, Chakrama FZ, Despouy G, Le Grand JN, Ducoroy P, Boireau W, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, Fraichard A, Delage-Mourroux R (2012) Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein. *Biochimie* **94**: 748-758
- Sethi N, Kang Y (2011) Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer* **11**: 735-748
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**: 1429-1433
- Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 283-296
- Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, Facchinetti V, Sabatini DM, Ballabio A (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J* **31**: 1095-1108
- Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X (2011) Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4788-4793
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 18030-18035
- Shen M, Duan WM, Wu MY, Wang WJ, Liu L, Xu MD, Zhu J, Li DM, Gui Q, Lian L, Gong FR, Chen K, Li W, Tao M (2015) Participation of autophagy in the cytotoxicity against breast cancer cells by cisplatin. *Oncol Rep*

- Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Metivier D, Maiuri MC, Kroemer RT, Kroemer G (2011) Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene* **30**: 4544-4556
- Shen Y, Liang LZ, Hong MH, Xiong Y, Wei M, Zhu XF (2008) [Expression and clinical significance of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin1 in epithelial ovarian cancer]. *Ai Zheng* **27**: 595-599
- Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH (2012) Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* **13**: 255-263
- Shi CY, Fan Y, Liu B, Lou WH (2013) HIF1 contributes to hypoxia-induced pancreatic cancer cells invasion via promoting QSOX1 expression. *Cell Physiol Biochem* **32**: 561-568
- Shibutani ST, Yoshimori T (2014) A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res* **24**: 58-68
- Shingu T, Fujiwara K, Bogler O, Akiyama Y, Moritake K, Shinojima N, Tamada Y, Yokoyama T, Kondo S (2009) Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int J Cancer* **124**: 1060-1071
- Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, Matsuura A, Noda T, Ohsumi Y (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J* **18**: 5234-5241
- Shoemaker JP (1978) Fifty-five percent complete remission of mammary carcinoma in mice with 5-fluorouracil and chloroquine. *Cancer Res* **38**: 2700-2702
- Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z (2008) The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *J Cell Sci* **121**: 2685-2695
- Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC *et al* (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**: 1371-1374
- Sobral AC, Neto VM, Traiano G, Percicote AP, Gugelmin ES, de Souza CM, Nakao L, Torres LF, de Noronha L (2015) Immunohistochemical expression of sulfhydryl oxidase (QSOX1) in pediatric medulloblastomas. *Diagn Pathol* **10**: 37
- Soloviev M, Esteves MP, Amiri F, Crompton MR, Rider CC (2013) Elevated transcription of the gene QSOX1 encoding quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. *PLoS One* **8**: e57327
- Song H, Zhang B, Watson MA, Humphrey PA, Lim H, Milbrandt J (2009) Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene* **28**: 3307-3319
- Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Pestell RG, Pavlides S, Lisanti MP (2012a) Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu Rev Pathol* **7**: 423-467
- Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Salem AF, Tsigos A, Lamb R, Sneddon S, Hult J, Howell A, Lisanti MP (2012b) Mitochondria "fuel" breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell Cycle* **11**: 4390-4401

- Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2006) Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *J Biol Chem* **281**: 3017-3024
- Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* **19**: 4762-4775
- Spencer B, Potkar R, Trejo M, Rockenstein E, Patrick C, Gindi R, Adame A, Wyss-Coray T, Masliah E (2009) Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci* **29**: 13578-13588
- Spowart JE, Townsend KN, Huwait H, Eshragh S, West NR, Ries JN, Kalloger S, Anglesio M, Gorski SM, Watson PH, Gilks CB, Huntsman DG, Lum JJ (2012) The autophagy protein LC3A correlates with hypoxia and is a prognostic marker of patient survival in clear cell ovarian cancer. *J Pathol* **228**: 437-447
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**: 44784-44790
- Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, Campello S, Nardacci R, Piacentini M, Campanella M, Cecconi F (2015) AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ* **22**: 419-432
- Stroecker AM, Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Price SM, Chen GJ, Mathew R, McMahon M, White E (2013) Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discov* **3**: 1272-1285
- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F (2004) The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* **9**: 611-618
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* **20**: 5971-5981
- Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, Yamamoto M (2012) Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13561-13566
- Tait SW, Ichim G, Green DR (2014) Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci* **127**: 2135-2144
- Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, Takebayashi A, Kita N, Takahashi K, Murakami T (2014) Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int* **14**: 53
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mule JJ, Pledger WJ, Wang HG (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**: 1142-1151
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* **25**: 795-800

- Taloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 190-195
- Tamai K, Tanaka N, Nara A, Yamamoto A, Nakagawa I, Yoshimori T, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K (2007) Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **360**: 721-727
- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, Youle RJ (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* **191**: 1367-1380
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**: 902-906
- Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Chu PY, Chai CY (2013) High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* **44**: 2558-2562
- Tanida I (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**: 2201-2214
- Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2003) GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun* **300**: 637-644
- Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, Kominami E (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* **10**: 1367-1379
- Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2004a) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* **279**: 36268-36276
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2002) Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* **277**: 13739-13744
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E (2001) 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* **276**: 1701-1706
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004b) Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* **279**: 47704-47710
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004c) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2503-2518
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* **445**: 77-88
- Thorpe C, Coppock DL (2007) Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem* **282**: 13929-13933
- Thorpe C, Hooper KL, Rajee S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK, Coppock DL (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* **405**: 1-12

- Tian W, Li W, Chen Y, Yan Z, Huang X, Zhuang H, Zhong W, Wu W, Lin C, Chen H, Hou X, Zhang L, Sui S, Zhao B, Hu Z, Li L, Feng D (2015) Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. *FEBS Lett*
- Tlsty TD, Coussens LM (2006) Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* **1**: 119-150
- Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1792**: 3-13
- Travelli C, Drago V, Maldi E, Kaludercic N, Galli U, Boldorini R, Di Lisa F, Tron GC, Canonico PL, Genazzani AA (2011) Reciprocal potentiation of the antitumoral activities of FK866, an inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, and etoposide or cisplatin in neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **338**: 829-840
- Tsuneoka M, Umata T, Kimura H, Koda Y, Nakajima M, Kosai K, Takahashi T, Takahashi Y, Yamamoto A (2003) c-myc induces autophagy in rat 3Y1 fibroblast cells. *Cell Struct Funct* **28**: 195-204
- Tuloup-Minguez V, Hamai A, Greffard A, Nicolas V, Codogno P, Botti J (2013) Autophagy modulates cell migration and beta1 integrin membrane recycling. *Cell Cycle* **12**: 3317-3328
- Tung YT, Hsu WM, Lee H, Huang WP, Liao YF (2010) The evolutionarily conserved interaction between LC3 and p62 selectively mediates autophagy-dependent degradation of mutant huntingtin. *Cell Mol Neurobiol* **30**: 795-806
- Turcotte S, Chan DA, Sutphin PD, Hay MP, Denny WA, Giaccia AJ (2008) A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* **14**: 90-102
- Tury A, Mairet-Coello G, Poncet F, Jacquemard C, Risold PY, Fellmann D, Griffond B (2004) QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens. *J Endocrinol* **183**: 353-363
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**: 664-666
- Uttenweiler A, Mayer A (2008) Microautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **445**: 245-259
- Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, 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**: 20235-20237
- Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**: 275-292
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B *et al* (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**: 1158-1160
- Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA (2009) Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One* **4**: e6251

- Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D (2007) Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol* **43**: 999-1006
- Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D (2009) Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions. *Cancer Microenviron* **2**: 49-57
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, Dulieu P, Remy-Martin JP, Jouvenot M, Fraichard A (2001) A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 118-125
- Vidal RL, Hetz C (2013) Unspliced XBP1 controls autophagy through FoxO1. *Cell Res* **23**: 463-464
- Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD (2010) Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal* **13**: 1699-1712
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**: 69-72
- Wang H, Sun HQ, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, Yin H (2015) GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 7015-7020
- Wang J, Pan XL, Ding LJ, Liu DY, Da-Peng L, Jin T (2013) Aberrant expression of Beclin-1 and LC3 correlates with poor prognosis of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One* **8**: e69038
- Wang M, Fudge K, Rhim JS, Stearns ME (1996) Cytokine regulation of the matrix metalloproteinases and their inhibitors in human papillomavirus-18 transformed human prostatic tumor cell lines. *Oncol Res* **8**: 303-315
- Wani WY, Boyer-Guittaut M, Dodson M, Chatham J, Darley-Usmar V, Zhang J (2015) Regulation of autophagy by protein post-translational modification. *Lab Invest* **95**: 14-25
- Waters S, Marchbank K, Solomon E, Whitehouse C, Gautel M (2009) Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett* **583**: 1846-1852
- Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2004) Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2541-2550
- Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W, Guan JL (2011) Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **25**: 1510-1527
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**: 678-688
- Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z (2011) LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev Cell* **20**: 444-454
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* **29**: 1792-1802
- Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 169-178

- White E (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**: 401-410
- Williams A, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2006) Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol* **76**: 89-101
- Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P (2012) Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* **22**: 43-61
- Wong CH, Iskandar KB, Yadav SK, Hirpara JL, Loh T, Pervaiz S (2010) Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PLoS One* **5**: e9996
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* **2**: 21-33
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **13**: 2004-2008
- Wu L, Nam YJ, Kung G, Crow MT, Kitsis RN (2010) Induction of the apoptosis inhibitor ARC by Ras in human cancers. *J Biol Chem* **285**: 19235-19245
- Wu SY, Lan SH, Cheng DE, Chen WK, Shen CH, Lee YR, Zuchini R, Liu HS (2011) Ras-related tumorigenesis is suppressed by BNIP3-mediated autophagy through inhibition of cell proliferation. *Neoplasia* **13**: 1171-1182
- Wu WY, Kim H, Zhang CL, Meng XL, Wu ZS (2014) Clinical significance of autophagic protein LC3 levels and its correlation with XIAP expression in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* **31**: 108
- Xie X, White EP, Mehnert JM (2013) Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS One* **8**: e55096
- Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102-1109
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, Zhang P, Gong R, Zhao S (2001) Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* **74**: 408-413
- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* **19**: 8469-8478
- Yang A, Rajeshkumar NV, Wang X, Yabuuchi S, Alexander BM, Chu GC, Von Hoff DD, Maitra A, Kimmelman AC (2014) Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov* **4**: 905-913
- Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, Chavan S, Rosas-Ballina M, Al-Abed Y, Akira S, Bierhaus A, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Tracey KJ (2010) A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11942-11947

- Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell'antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N, Kimmelman AC (2011) Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* **25**: 717-729
- Yang Z, Klionsky DJ (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**: 1-32
- Yang Z, Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 124-131
- Yi J, Tang XM (1999) The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells. *Cell Res* **9**: 243-253
- Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, Song YS, Oh JS, Park BS, Kwon TK, Park C, Choi YH, Yoo YH (2012) Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol* **41**: 1443-1454
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1542-1552
- Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Uchiyama Y, Monden M (2008) LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol* **33**: 461-468
- Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 9-14
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **119**: 3888-3900
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**: 798-803
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**: 1124-1132
- Yu QC, Marzella L (1986) Modification of lysosomal proteolysis in mouse liver with taxol. *Am J Pathol* **122**: 553-561
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15077-15082
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **283**: 10892-10903
- Zhang J (2013) Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol* **1**: 19-23
- Zhang Y, Wang F, Han L, Wu Y, Li S, Yang X, Wang Y, Ren F, Zhai Y, Wang D, Jia B, Xia Y, Chang Z (2011) GABARAPL1 negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell Physiol Biochem* **27**: 503-512
- Zhao X, He Y, Chen H (2013) Autophagic tumor stroma: mechanisms and roles in tumor growth and progression. *Int J Cancer* **132**: 1-8

- Zhao Y, Yang J, Liao W, Liu X, Zhang H, Wang S, Wang D, Feng J, Yu L, Zhu WG (2010) Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nat Cell Biol* **12**: 665-675
- Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan YY, Granter SR, Chin L, Cantley LC (2009) Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol Cell* **33**: 237-247
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* **11**: 468-476
- Zhou J, Tan SH, Nicolas V, Bauvy C, Yang ND, Zhang J, Xue Y, Codogno P, Shen HM (2013) Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Res* **23**: 508-523
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**: 221-225
- Zhu H, Wang D, Zhang L, Xie X, Wu Y, Liu Y, Shao G, Su Z (2014) Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1alpha promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia. *Oncol Rep* **32**: 935-942
- Zhu K, Dunner K, Jr., McConkey DJ (2010) Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* **29**: 451-462
- Zhu W, Pan X, Li F, Zhang Y, Lu X (2012) Expression of Beclin 1 and LC3 in FIGO stage I-II cervical squamous cell carcinoma and relationship to survival. *Tumour Biol* **33**: 1653-1659
- Zou Z, Yuan Z, Zhang Q, Long Z, Chen J, Tang Z, Zhu Y, Chen S, Xu J, Yan M, Wang J, Liu Q (2012) Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells. *Autophagy* **8**: 1798-1810

ANNEXES

**REVUE : “INTERPLAY BETWEEN ROS AND
AUTOPHAGY IN CANCER CELLS, FROM TUMOR
INITIATION TO CANCER THERAPY”**

Poillet-Perez L., Despouy G., Boyer-Guittaut M. and Delage-Mourroux R.

Redox biology (2015)



Mini Review

Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy



Laura Poillet-Perez, Gilles Despouy, Régis Delage-Mourroux, Michaël Boyer-Guittaut*

Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922 «Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central», SFR IBCT FED4234, UFR Sciences et Techniques, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2014
 Received in revised form
 8 December 2014
 Accepted 9 December 2014
 Available online 10 December 2014

Keywords:

ROS
 Mitochondria
 Antioxidant
 Mitophagy
 Autophagy
 Cancer

ABSTRACT

Cancer formation is a complex and highly regulated multi-step process which is highly dependent of its environment, from the tissue to the patient. This complexity implies the development of specific treatments adapted to each type of tumor. The initial step of cancer formation requires the transformation of a healthy cell to a cancer cell, a process regulated by multiple intracellular and extracellular stimuli. The further steps, from the anarchic proliferation of cancer cells to form a primary tumor to the migration of cancer cells to distant organs to form metastasis, are also highly dependent of the tumor environment but of intracellular molecules and pathways as well. In this review, we will focus on the regulatory role of reactive oxygen species (ROS) and autophagy levels during the course of cancer development, from cellular transformation to the formation of metastasis. These data will allow us to discuss the potential of this molecule or pathway as putative future therapeutic targets.

© 2014 Elsevier B.V.. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

Introduction	184
Relationship between autophagy and ROS	185
Autophagy, ROS and tumorigenesis	185
Autophagy, ROS, tumor progression and metastasis	187
Autophagy, ROS and stroma–tumor relationship	188
Autophagy, ROS and cancer therapy	188
Conclusions	190
Acknowledgment	190
References	190

Abbreviations: ; 3-MA, 3-methyladenine; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATG, autophagy related gene; ATG8, autophagy related gene 8; BNIP3, BCL-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3; EMT, epithelial-mesenchymal transition; GABARAP, GABA_A receptor-associated protein; GABARAPL1, GABARAP protein-like 1; GEC1, glandular epithelial cell 1; GABARAPL2, GABARAP protein-like 2; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; HMGB1, high-mobility group protein B 1; HSP, heat shock protein; KEAP1, Kelch-like ECH-associated protein 1; LC3, light chain 3; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; NRF2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PINK1, PTEN induced putative kinase 1; ROS, reactive oxygen species; SQSTM1, sequestosome 1; ULK1, unc-51 like autophagy activating kinase 1

* Corresponding author: Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922, SFR IBCT FED4234, UFR-ST, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France.

E-mail address: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr (M. Boyer-Guittaut).

Introduction

Macroautophagy (hereafter called autophagy) is a multi-step process which maintains cellular homeostasis via the degradation and recycling of long-lived proteins, intracellular aggregates as well as damaged organelles. This process requires the intervention of about 40 proteins and leads to the formation of a double membrane structure, called the phagophore, which engulfs part of the cytoplasm as well as organelles, to form an autophagosome. This vesicle ultimately fuses with the lysosome to induce the formation of an autophagolysosome and the degradation and recycling of its content [1]. The induction of autophagy is regulated by several kinase cascades but the main regulator of the induction

of the phagophore formation stays the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase which can integrate the different extracellular stresses (for a review, see [2]). Following inhibition of mTORC1, unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1)/ATG1 and phosphatidylinositol kinase 3 (PI3K) are subsequently activated to induce the initiation of the formation of a phagophore. The elongation of the double membrane structure is then activated by two post-translational modifications, similar to those described during ubiquitinylation or SUMOylation, leading to the covalent addition of ATG12 onto ATG5 and ATG8 family members onto phospholipids. The latter is considered to be correlated to the levels of autophagy and therefore to be accepted as a direct marker of intracellular autophagy.

Autophagy is regulated by numerous stresses such as nutrient starvation, hypoxia, ATP/AMP ratio, intracellular ROS levels, bacteria and virus infection or chemical drugs. This cellular pathway, first believed to be non-specific, is now divided in basal or induced autophagy which can be either not selective or selective [3]. The latter requires cargo adapter proteins, such as Sequestosome 1 (SQSTM1)/p62, neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) or Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 long form (NIX/BNIP3L), to induce the recruitment of cargos, which are the molecules or organelles targeted for degradation, into the autophagosomes. This step also requires an interaction between the cargo adapters and the ATG8 family proteins (LC3, GABARAP, GABARAP1/GEC1 and GABARAP2) via two domains present within the cargo adapter proteins: an Ubiquitin Binding domain (UBA) recognizing ubiquitinated substrates, and a LC3-interaction domain (LIR) recognizing ATG8 proteins [4–7]. Amongst the different types of selective autophagy, we can cite mitophagy, inducing the degradation of damaged mitochondria, xenophagy, leading to the degradation of extracellular pathogens, and aggrephagy, allowing the degradation of intracellular aggregates [8].

Autophagy has been described to be involved in biological processes such as cellular homeostasis, development and immune response but it has also been demonstrated to be deregulated in different pathologies, in particular neurodegenerative diseases or cancers [9]. If it is now well accepted that autophagy presents a protective role in neurodegenerative diseases, its effect is far more complex and paradoxical in cancers. According to the stage of the tumor as well as the tissue or the cells targeted, the role of autophagy can be positive or negative for the growth of the tumor [10–12]. For example, autophagy can prevent the transformation of healthy cells into cancerous cells but can also induce resistance to chemotherapeutic treatments. More importantly, this positive or negative effect seems to be directly correlated to autophagy levels induced by different intracellular or extracellular stressors such as ROS accumulation.

In this review, we will describe the link between ROS production and its effect on autophagy during the different stages of the formation of a tumor: cellular transformation, tumor growth, interaction between stroma and cancer cells, induction of metastasis and response to chemical treatments.

Relationship between autophagy and ROS

ROS are a group of molecules including superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}) and hydrogen peroxide (H_2O_2). These molecules are synthesized within the cells through oxygen metabolism and represent, at low levels, important signaling molecules [13]. Moreover, ROS can also be involved in oxidative stress which is characterized by elevated intracellular levels of ROS leading to proteins, lipids and DNA damage [14]. In healthy cells, mitochondria produce the majority of intracellular ROS through the leaking of electrons from the electron transport chain during

oxidative phosphorylation [15,16]. Intracellular ROS levels can then increase the mitochondrial dysfunction inducing the accumulation of high concentration of ROS, oxidation of proteins, lipids and DNA, redox imbalance and oxidative stress [17,18]. Moreover, ROS can also play an important role in inflammation by inducing the secretion of pro- or anti-inflammatory molecules regulating the different steps of cancer development (for a detailed review, see [19]).

As previously described, ROS levels have been shown to regulate autophagy induction in the cells. In a specific manner, induction of autophagy following nutrient starvation requires the production of H_2O_2 that oxidizes ATG4, an enzyme involved in ATG8 protein maturation and delipidation. This oxidation modification mainly inactivates the delipidation activity of ATG4 leading to an increased formation of LC3-associated autophagosomes [20] (Fig. 1(1)). In an indirect manner, ROS can regulate autophagy through AMP-activated protein kinase (AMPK). Indeed, oxygen and nutrient deprivation induce AMP:ATP accumulation and activation of AMPK leading to the inhibition of mTORC1 and to autophagy induction [21,22]. AMPK also regulates autophagy by phosphorylating ULK1/ATG1, activation which is necessary to induce autophagy upon starvation [23–25]. AMPK is sensitive to oxidative stress and can be phosphorylated by the upstream kinase AMPK kinase (AMPKK) following H_2O_2 accumulation, leading to its activation and to an indirect induction of autophagy [26] (Fig. 1(2)). ROS can also regulate autophagy through the regulation of transcription factor activity such as NF- κ B leading to the induction of autophagy gene expression (*BECLIN1/ATG6* or *SQSTM1/p62*) in cancer cells [27–29].

Autophagy, ROS and tumorigenesis

Recent studies have described a complex role of the autophagy pathway during tumor initiation. On one hand, autophagy protects against the production of ROS in the cells and therefore inhibits their deleterious effect on DNA mutation, which have been extensively described to induce tumorigenesis, defined as the transformation of a normal cell into a cancer cell [30,31] (Fig. 2). Autophagy is then considered as a tumor suppressor mechanism by mainly preventing ROS accumulation through elimination of damaged mitochondria which are known to be the major source of ROS. This selective autophagy, called mitophagy, is mediated by two different molecular pathways: NIX/BNIP3L and PARKIN (PARK2)/PTEN induced putative kinase 1 (PINK1) [32–35]. Nix/BNIP3L interacts with GABARAP and GABARAP1 at the autophagosome and targets mitochondria for degradation [36,37]. PARKIN/PINK1 allows the selective degradation of damaged and dysfunctional mitochondria in response to mitochondrial membrane depolarization induced by ROS [38] (Fig. 1(4)). It has been previously shown that elimination of damaged mitochondria by autophagy leads to decreased ROS production, thereby limiting tumor-promoting effect of ROS [39]. Consequently, autophagy inhibition, following *ATG5* or *ATG7* deletion, leads to chronic oxidative stress, accumulation of damaged mitochondria, tissue damage and inflammation which all favor tumor initiation [40–42]. Moreover, autophagy can regulate oxidative stress through the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)/kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) and SQSTM1/p62 pathway [43,44]. SQSTM1/p62, an autophagy substrate and cargo adapter, can interact with and target KEAP1 to the autophagosomes leading to its selective degradation [45] and the release of NRF2 which can then translocate to the nucleus and activate antioxidant-defense genes, such as glutathione peroxidase, superoxide dismutase and thioredoxin [46] (Fig. 1(5)). Upon normal conditions, NRF2 is sequestered by KEAP1 and inactivated by proteasomal degradation. Following oxidative stress, either ubiquitin activity of KEAP1 is inhibited or

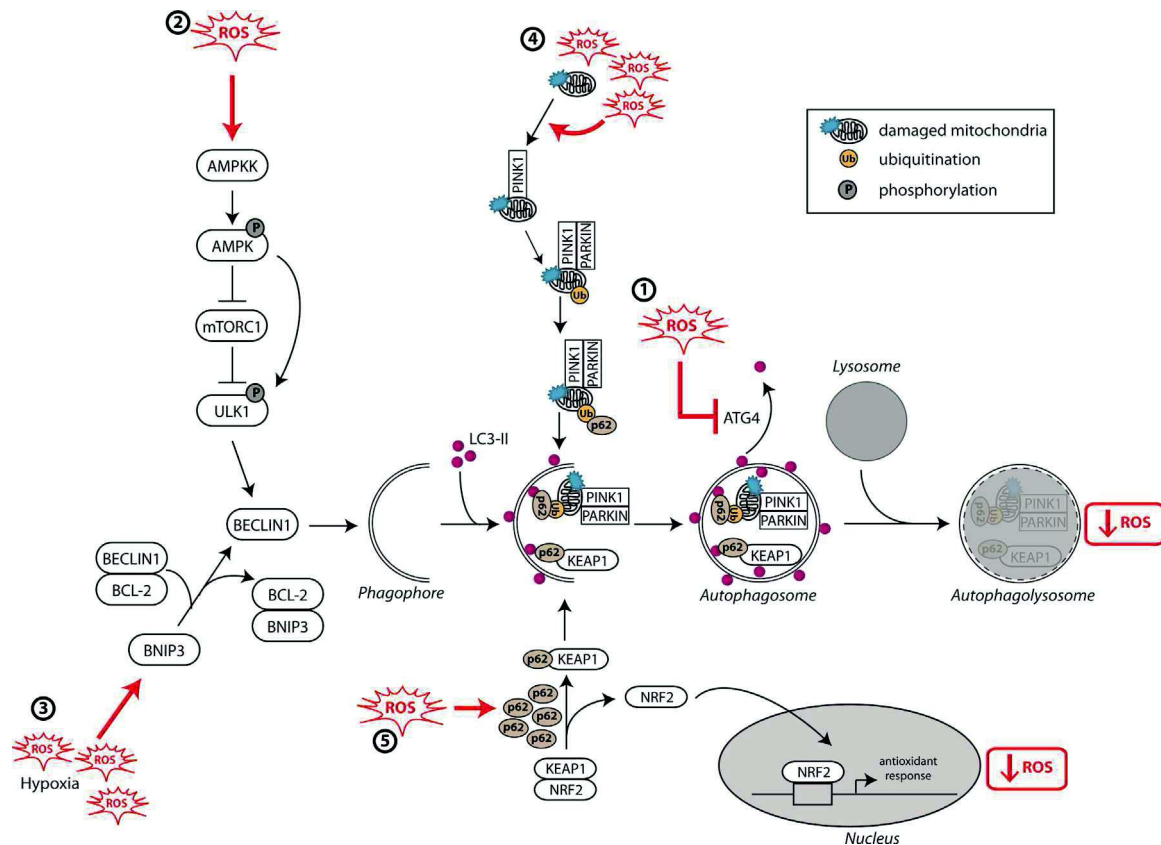


Fig. 1. Relationship between autophagy and ROS. ROS levels regulate autophagy levels by different pathways such as: (1) oxidation of ATG4 leading to accumulation of autophagosomes, (2) activation of the AMPK signaling cascade inducing the initiation of autophagy through the ULK1 complex, (3) disruption of BECLIN1–BCL-2 interaction leading to the initiation of autophagy or (4) alteration of mitochondria homeostasis leading to mitophagy activation. Autophagy inhibits ROS accumulation through (4) the elimination of damaged mitochondria by mitophagy or (5) the degradation of KEAP1 by selective autophagy mediated by SQSTM1/p62 and the expression of NRF2-regulated antioxidant genes.

SQSTM1/p62 is up-regulated and interacts with KEAP1 leading to the inhibition of the degradation of NRF2 and to its activation.

Autophagy also presents a tumor-suppressive role by regulating chronic inflammation which has been described as an important risk of cancer initiation such as in liver cancer [47,48]. Inflammation is an important process activated by a loss of tissue or cell homeostasis which can be induced by tissue damage, cell death or pathogen infection. The activation of inflammation leads to the release of soluble molecules (cytokines, chemokines, ROS, matrix proteinases or vascular epithelial growth factor, VEGF) by macrophages and mast cells in order to activate the recruitment and infiltration of leukocytes at the site of injury. Several studies have shown that autophagy defects following deletion of ATG16L1, BECLIN1 or LC3B induce an accumulation of damaged mitochondria and mitochondrial ROS leading to an induction of inflammation linked to increased levels of IL-1 β and IL-18 [49–52]. Indeed, ROS generation activate pro-inflammatory factors such as the NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome [50,52], a multiprotein complex responsible of maturation and secretion of these pro-inflammatory cytokines. But, IL-1 has also been demonstrated to be involved in the production of ROS and high levels of IL-1 have been associated with a poor prognosis [53]. Moreover, autophagy also increases the extracellular release of nuclear protein high-mobility group box protein 1 (HMGB1) depending of its redox status [54,55]. The secreted HMGB1 can then be recognized by different membrane receptors such as toll-like receptors (TLR2, 4 and 9) or macrophage-1 antigen (Mac-1) leading to the acceleration of the pro-inflammatory response dependent on cytokines and type-I interferon (IFN) and later to tumor progression as well as metastasis [56]. Defects of autophagy therefore lead to an

inflammatory environment which contributes to cancer initiation. However, the interplay between inflammatory cytokines and cancer remains unclear given the pro- and anti-tumoral effect of these molecules depending on the tumor context.

During later stages of tumor initiation, autophagy is required for cell transformation by the RAS oncogene in order to promote cell tolerance to stress (Fig. 2). Indeed, autophagy inhibition reduces transformation, proliferation of mouse embryonic fibroblasts (MEF) transformed with HRAS and MDA-MB-231 breast cancer cells presenting ectopic KRAS expression [57]. In these models, autophagy is necessary for energy production during transformation thanks to its role in glucose uptake and glycolytic flux. Moreover, other studies have shown that immortalized baby mouse kidney (iBMK), MCF-10A and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines described to express oncogenic RAS present high levels of basal autophagy and that inhibition of autophagy following ATG5 or ATG7 deletion prevent RAS-induced growth and proliferation [58–60]. This observation could be explained by the fact that mitochondrial respiration is necessary for RAS-induced tumorigenesis and that active autophagy is necessary to maintain cellular homeostasis [61]. Indeed, impairment of autophagy in these different models is associated with decreased cell survival, accumulation of damage mitochondria and oxidative stress suggesting that activation of oncogenic RAS induces autophagy to sustain metabolic needs and lead to an “addiction” of cells to autophagy [58,59,62–64]. Moreover, deficiency in SQSTM1/p62 has been shown to reduce tumorigenicity and increase ROS levels following RAS activation [58,65,66].

Similar results were obtained in a different model of tumorigenesis. Inhibition of autophagy by FAK family-interacting protein

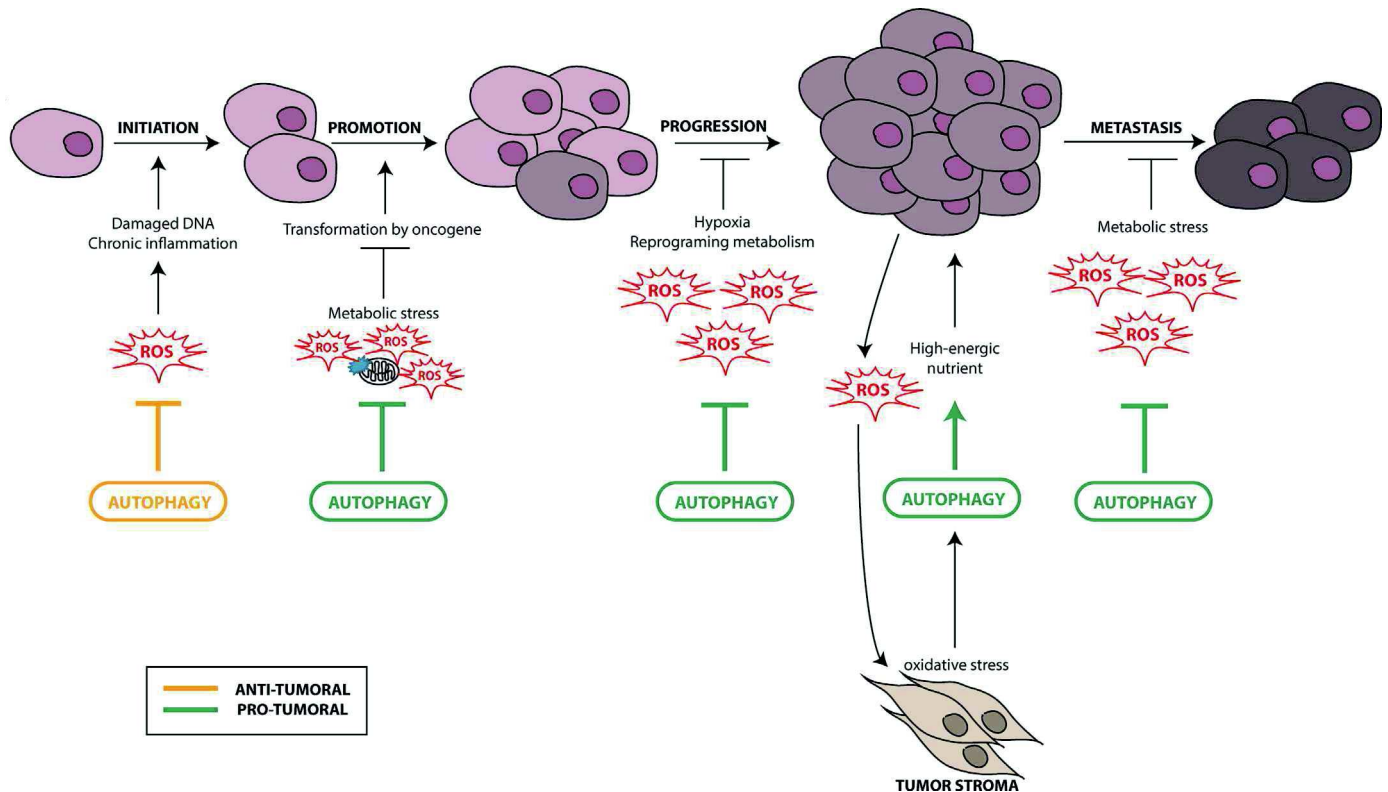


Fig. 2. Autophagy, ROS and cancer. The role of autophagy in cancer depends on the tissue, the stage and the type of tumor. During the early steps of cancer development, autophagy plays a protective role by preventing ROS-induced damages on DNA and protein leading to an inhibition of tumorigenesis. During the late steps of cancer development (promotion, progression and metastasis), autophagy presents a pro-tumoral role through the elimination of ROS-induced metabolic stress and the production of nutrients required for cancer cell survival. During the development of the primary tumor, a strong interaction between stroma cells of the microenvironment and cancer cells has been observed. The cancer cells under hypoxia induce the formation of ROS which can activate autophagy in stroma cells. These cells will then provide high-energetic nutrients, such as lactate or ketones, necessary for cancer cell survival and proliferation.

of 200 kDa (*FIP200*) deletion in an *in vitro* breast cancer model driven by the polyoma virus middle T (PyMT) oncogene leads to decreased tumor initiation and progression associated with an increased number of mitochondria presenting an abnormal morphology [67], confirming the pro-tumorigenic role of autophagy.

Taken together, these studies confirm the complex and paradoxical role of autophagy in cancer initiation. Indeed, autophagy can act as a tumor suppressive mechanism during early stages of cancer development through the prevention of inflammation and genome instability [41,42] but can also induce cancer cell survival during transformation-induced metabolic stress [68,69].

Autophagy, ROS, tumor progression and metastasis

During *in vivo* tumor formation, autophagy has been shown to be necessary for the cancer cells to survive under hypoxic stress before the vascularization of the tumor [30]. Even if the mechanism is still unclear, many studies suggest a role of autophagy in the regulation of cancer cell metabolism allowing them to meet requirements for rapid proliferation.

High levels of autophagy are indeed observed in hypoxic regions of tumors and autophagy has been described to be activated by hypoxia (lack of adequate oxygen supply) and ischemia (glucose deprivation and hypoxia) to promote survival of cancer cells [41,42,64] (Fig. 2). Hypoxia induces ROS production leading to the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) [70]. HIF-1 α , a key regulator of oxygen homeostasis, induces mitophagy through expression of Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 (BNIP3) allowing the cells to survive during prolonged hypoxia by preventing increased levels of ROS [71]. Indeed, BNIP3 is an HIF-1 α target gene and disrupts the interaction between

BECLIN1/ATG6 and BCL-2, inducing its release and autophagy induction [72] (Fig. 1(3)). Disruption of autophagy by *BECLIN1*, *ATG5* or *ATG7* knockdown leads to hypoxia-induced cell death. BNIP3-induced autophagy is necessary to prevent the increase in ROS production during hypoxia [73] and therefore represents a survival adaptive mechanism [69,74]. Autophagy can also be induced, independently of HIF-1 α , by different pathways such as AMPK and Unfolded Protein Response (UPR) during hypoxia [75,76]. Moreover, cancer cells require higher bioenergetic needs than normal cells leading to a reprogramming of metabolism. This includes the recycling of intracellular components to increase the production of ATP and tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates which in return leads to accumulation of ROS due to increased oxidative phosphorylation [10,77,78].

Tumor progression and aggressiveness are characterized by metastasis, epithelial–mesenchymal transition (EMT) and angiogenesis. Metastasis is a multi-step process which allows cancer cells to migrate to distant organ sites [79,80]. EMT is the first step of metastasis and is characterized by the loss of epithelial properties as well as the acquirement of mesenchymal properties leading to increased cell mobility [81]. Previous studies have described a pro-metastasis role of autophagy (Fig. 2). For example, inhibition of autophagy by *FIP200* deletion leads to a decrease in metastatic potential associated with an accumulation of damaged mitochondria which could lead to increased level of ROS [67]. Moreover, increased autophagy in human cancer is associated with metastasis and poor prognosis for patients with melanoma and breast cancer [82,83]. Interestingly, autophagy also promotes resistance to anoikis (detachment-induced cell death) and invasion [84,85], two processes necessary for colonization of other organs. Indeed, detachment of cells from the primary tumor

induces autophagy which in return provides resistance to anoikis [57,86,87] which is necessary for the metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) and mammary epithelial cells (MEC) [88,89]. During detachment from the extracellular matrix (ECM), epithelial cells present modifications of their metabolism, including a reduction of ATP production and increased ROS production [90], which will lead to AMPK-induced autophagy in response to metabolic stress [23] or to protein kinase like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-induced autophagy in response to oxidative stress [91]. Inhibition of autophagy by knock-down of *ATG12* or deficiency in *SQSTM1/p62* also leads to a decrease in invasion and migration phenotypes correlated with metabolism defects in glioma and glioblastoma cells [92,93]. Similarly, autophagy increases HCC invasion abilities through activation of EMT [94]. Moreover, inhibition of autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) leads to tumor regression of xenografts and orthotopic models and mice prolonged survival [59].

However, the role of autophagy in metastasis is still a double-edged sword [95] and autophagy can also inhibit autophagy independently of ROS. Autophagy can inhibit metastasis by activating the release of HMGB1 which induces an anti-tumor immune response [95]. Autophagy may also regulate metastasis by inhibiting tumor necrosis and immune cell infiltration necessary for this metastasis [64,96,97]. Similarly, autophagy can inhibit EMT by degrading SNAIL and TWIST, two major regulators of this process, leading to decreased EMT and invasion phenotypes [98]. We can hypothesize that autophagy might also inhibit EMT through elimination of ROS and inhibition of inflammation. In fact, EMT can be induced by IL-1, IL-6 or TGF β cytokines which regulate SNAIL or TWIST. ROS can also induce HIF-1 α and lysyl oxidase (LOX) expression leading to decreased levels of E-Cadherin associated with an activation of EMT and cancer cell migration [99].

Angiogenesis is a key step during tumor growth and metastasis [100] but the relationship between angiogenesis and autophagy is poorly understood. Indeed, several studies have shown that angiogenesis inhibitors induce autophagy and apoptosis in endothelial cells, independently of nutrient or hypoxia stresses [101,102]. On the contrary, treatment of human aortic endothelial cells (HAEC) with chemerin, an angiogenesis stimulator, increases ROS production in association with an upregulation of autophagy genes [103].

Angiogenesis has also been described to be regulated by inflammation. Indeed, hypoxic cancer cells present elevated levels of HIF-1 α which lead to the expression of angiogenic factors such as VEGF which can also be released by activated immune cells (e.g. macrophages) during inflammation. Therefore, autophagy would allow cell survival under hypoxia and starvation in the tumor core while inflammation would lead to the induction of angiogenesis, two processes regulated by ROS accumulation.

Autophagy, ROS and stroma–tumor relationship

Tumor stroma is a compartment which includes different cell types such as myofibroblasts/cancer-associated fibroblasts (CAFs), immune cells, endothelial and adipocyte cells. These cells are in constant interaction with tumor cells and can regulate tumor cell proliferation, tumor growth, progression and metastasis [104]. Tumor stroma is characterized by the presence of different stress factor such as hypoxia, high level of ROS, high metabolic stress and lack of growth factors which can induce autophagy in several tumor compartments and especially in CAFs [105–110]. Recent studies highlighted a discrepancy in the autophagic activities between tumor and stroma cells and a model called "the autophagic tumor stroma model of cancer metabolism" has been proposed by the authors [111–115] (Fig. 2). In this model, cancer cells can induce an oxidative stress mimicking hypoxia in CAFs and therefore

increasing ROS production. This stress activates the transcription factors HIF-1 α and NF- κ B leading to the induction of autophagy and mitophagy in the microenvironment surrounding the tumor. The increase of autophagy in tumor stroma allows cells to survive against senescence and induce the secretion of recycled and high-energetic nutrients, such as ketone and lactate, which will feed cancer cells during tumor growth and metastasis [116–119]. Moreover, ROS production in fibroblasts increases DNA damage, genomic instability and stemness in cancer cells, mechanisms essential for tumor progression.

Therefore, contrary to the initial "Warburg effect" dogma describing that cancer cells rely mainly on glycolysis during tumor growth, cancer cells are now described to present a decreased autophagy flux, a high oxidative phosphorylation and a high ROS production. On the other hand, while the stroma cells rely on a high autophagic activity which is believed to recycle the nutrients necessary in order to 'feed' the adjacent proliferating cancer cells. This model has been confirmed by a genome wide transcriptional analysis which demonstrated that more than 95 mitochondrial-associated genes were up-regulated in human breast cancer cells [120]. Among these genes, 40 were involved in mitochondrial translation of proteins of the oxidative phosphorylation chain. More interestingly, these genes were not expressed, or only at very low levels, in the adjacent stroma cells and some of these markers were associated with a poor clinical outcome. The authors conclude that the tumor cells should be seen as a "parasite undergoing anabolic reprogramming to accentuate its mitochondrial power".

These two models can be combined to describe the oxidative phosphorylation active/non-autophagic cancer cells to be 'fed' in nutrients by the glycolytic/autophagic stroma cells.

Autophagy, ROS and cancer therapy

According to the recent paradigm, autophagy has been shown to be induced by and to protect against cellular stress induced by numerous drugs used in cancer treatment. These observations led to the development of several clinical trials involving the addition of an inhibitor of the autophagy flux, such as hydroxychloroquine, together with a drug already in use in cancer treatment in order to potentiate its effect (for a review, see [121]). More interestingly, various anti-cancer treatments have been shown to activate ROS-induced autophagy which in turn leads to either the development of cell drug resistance or to the induction of apoptosis or both. Regarding the complexity of cellular effects observed during cancer therapy, several models have been proposed, each involving an important role of ROS as well as autophagy or apoptosis. The first model describes the use of anticancer drugs inducing the accumulation of ROS leading to cell death. Nevertheless, the accumulation of ROS also increased cytoprotective autophagy levels leading to cancer cell drug resistance and cancer cell survival. In this particular case, the use of autophagy inhibitors restored the sensitivity to the treatment (Fig. 3(1)). One example is the use of Cyclopiroxolamine (CPX) in human rhabdomyosarcoma (Rh30 and RD) cells which induces ROS-induced cytoprotective autophagy. The authors demonstrated the activation of the Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAP kinase (p38 MAPK) signaling cascade by CPX and ROS but only JNK has been shown to be directly involved in autophagy induction [122]. In the second model, Honokiol, a drug currently in development for the treatment of prostate cancer, induces autophagy *in vitro* and in tumors in mice models inducing cell drug resistance. The inhibition of drug-induced autophagy by 3-methyladenine (3-MA) or *ATG5* siRNA led to increased cancer cell death *via* apoptosis [123] (Fig. 3(2)). Moreover, the authors showed that the use of

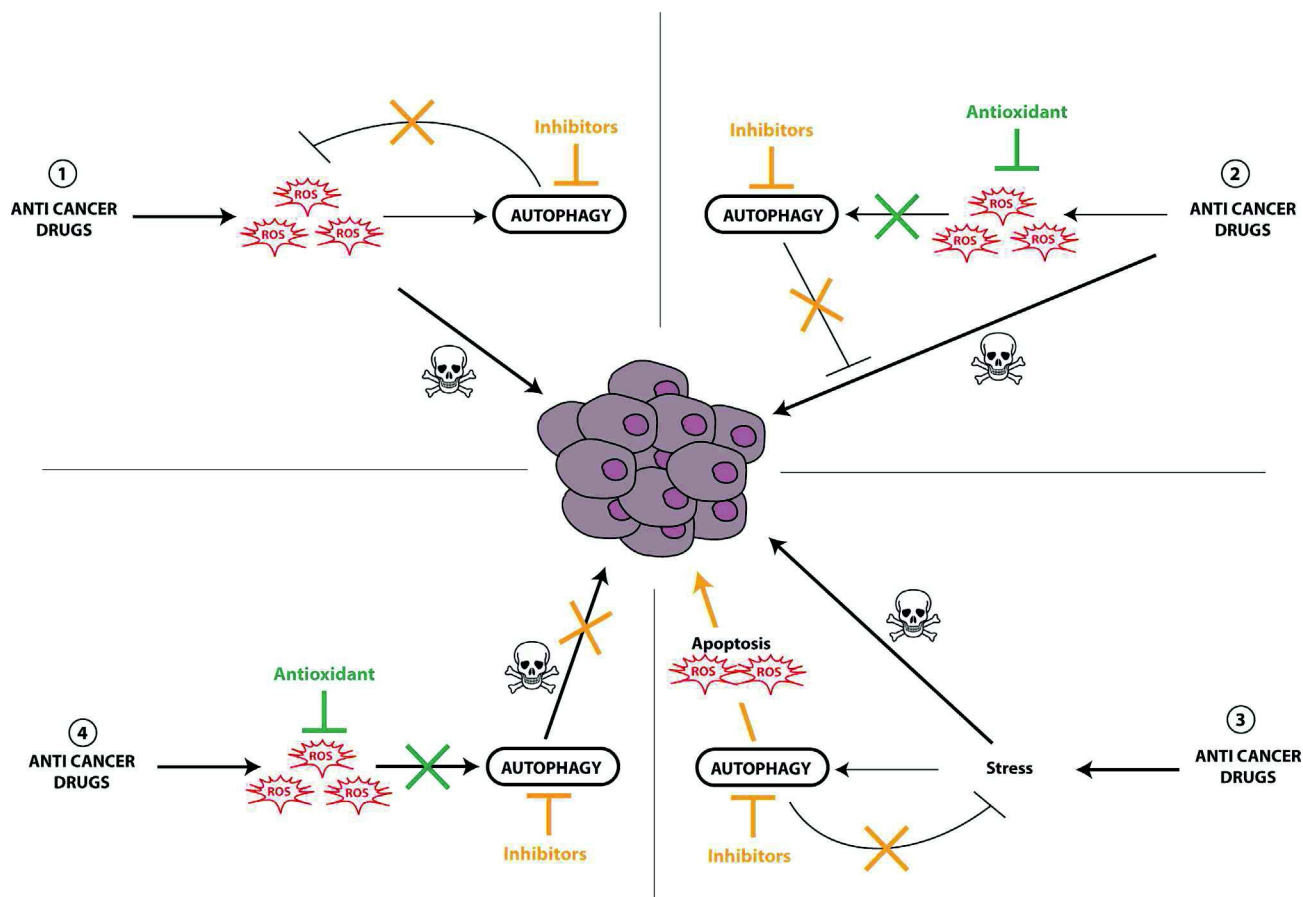


Fig. 3. Interplay between ROS and autophagy in the regulation of therapy efficiency. Anti-cancer treatments can increase ROS-induced autophagy leading to cell drug resistance (1–3). Given these observations, inhibitors of autophagy (1–3) or antioxidants (2) might be used to potentiate or restore the cytotoxicity effect of the drug. Regarding the fourth model, ROS accumulation induces cytotoxic autophagy and apoptosis therefore the use of autophagy inhibitors or antioxidants would inhibit the effect of the drug (4). These four models, involving ROS, autophagy and apoptosis, point out the difficulty to find the most relevant combination of autophagy inhibitors or antioxidants together with anti-cancer drugs in cancer therapy and the necessity to first characterize and understand the cancer cell response to cancer therapies.

antioxidants (N-acetylcysteine, catalase, superoxide dismutase) in their models inhibits autophagy levels demonstrating the direct involvement of ROS in the induction of autophagy. This model can also explain the effects observed with drugs targeting mitochondria, such as Mitoquinone in MDA-MB-231 cells [124] or Quercetin in human glioblastoma cells (U373MG) [125]. The alteration of mitochondria homeostasis would increase ROS levels but also activate autophagy, the latter leading to cell survival by degrading damaged mitochondria. Inhibiting autophagy levels, by 3-MA, chloroquine or ATG7 knockdown, will restore the effect of the compound through induction of ROS-induced apoptosis. A third model has been described for the use of 3-bromopyruvate (3BrPA), an inhibitor of hexokinase II involved in glycolysis, in breast cancer cells (MDA-MB-231) or artemisinin, an anti-malaria drug, in human lung cancer cells (A549). The authors proposed that increased ROS-induced apoptosis was the consequence of the combined treatment of 3BrPA and chloroquine and that ROS accumulation was not the cause of the induction of autophagy [126] (Fig. 3(3)). In this model, the addition of autophagy inhibitors together with the anticancer drug would increase cell death but an antioxidant would not. A fourth model has been described in breast cancer cell lines using carnosol, a polyphenol, which induced early ROS-induced autophagy and late apoptosis leading to cell death [127]. The authors showed that autophagy and cell death were correlated to mitochondrial damage as well as increased ROS levels. In this model, the authors demonstrated the tight link between autophagy and apoptosis and that autophagy inhibitors and antioxidants would inhibit cancer cell death (Fig. 1(4)). Similar data

were obtained with psoralidin or Resveratrol which increased ROS accumulation and autophagy levels leading to human lung cancer (A549) and human colon cancer (HT-29, COLO 201) cell death, respectively. These effects were blocked by the addition of 3-MA or antioxidants [128,129].

Altogether, these studies highlight the complexity of choosing the right treatment for a specific patient or a specific tumor. This observation led researchers to adapt their protocols to the genetic or biochemical background of each patient, a procedure called theranostics or personalized medicine. This approach is based on the development of new diagnostic protocols, targeting new specific biomarkers, whose results would lead to the use of a specific targeted therapy. In regards of the interplay of ROS and autophagy, the first difficulty will be to find easy and rapid protocols to quantify both ROS and autophagy levels *in cellulo*, *in situ* and *in vivo*. Regarding ROS levels, some protocols have already been set up to quantify *in vivo* levels. We can cite the use of fluorescent probes regulated by ROS such as Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), Dihydrorhodamine 123 (DHR) or Amplex UltraRed, a highly specific fluorogenic substrate used to detect H_2O_2 in human skeletal muscle [130,131], or the use of spin probes, modified by ROS, and detected in human tissues by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) [132]. A second protocol would consist of the detection of biological molecules modified *in vivo* by ROS and then considered as biomarkers. For example, we can cite the 15-F_{2t}-IsoP(8-Iso-PGF_{2α}) which gives a major urinary metabolite (2,3-Dinor-5,6-Dihydro-15-F_{2t}-IsoP(F₂-IsoP-M)) following oxidation [133]. A third, but indirect possibility would be to quantify

mitochondrial activity, which is described as a major cause of ROS accumulation in tissues, by using fluorescent probes. For example, 18F-fluorobenzyl triphenylphosphonium cation (18F-FBnTP) has been used as a PET (Positron emission tomography) imaging probe to quantify mitochondrial membrane potential defects *in vivo* in breast or prostate cancers [134]. The major problem will be to accurately quantify autophagy levels in cancer and stroma cells. Indeed, LC3B levels have been described as an accurate marker of the number of autophagosomes in cells but we also know that an accumulation of these intracellular vesicles can be linked to an increase of autophagy induction or an inhibition of autophagosome degradation by the lysosomes. To our knowledge, no other autophagy marker is currently available in order to discriminate between an increase or a decrease of overall autophagy flux *in vivo* [135]. Therefore, before using the pair autophagy/ROS as new cancer biomarkers to choose the adequate therapy protocol, research will have to develop new diagnostic tests to quantify these markers *in vivo*.

Conclusions

In this review, we summarized the current data showing the involvement of ROS signaling and autophagy during the course of cancer initiation, progression as well as response to cancer therapy but more importantly, we pointed out the complex interplay between these two cellular signal and mechanism. Taken together, these data particularly demonstrate that the effects of ROS and autophagy are different according to the stage of the development of the tumor. Precautions will have to be taken before considering the choice of a particular treatment since we showed that, according to the drug used, ROS or autophagy can favor or inhibit the applied treatment. Therefore a potential new way of cancer treatment might be to include antioxidants or autophagy inhibitors to inhibit cytoprotective ROS-induced autophagy during the course of treatment. But, in some cases, adding antioxidants or autophagy inhibitors might also decrease ROS or autophagy-induced cell death. It is therefore now clear that, in the future, in order to choose the more efficient combination of drugs for each treatment, an extensive knowledge of the cellular events occurring in each particular tumor category (tissue, cells, stage, autophagy levels, ROS levels) would be necessary to tightly regulate the balance between ROS accumulation and ROS-induced autophagy or apoptosis and induce cancer cell death and tumor regression *in vivo*. The future of cancer treatment will require the development of personalized medicine, called theranostic, and the development of 'one specific treatment for one specific tumor in one patient'.

Acknowledgment

Laura Poillet is supported by a fellowship of the (12V131). This work is supported by funding from the Ligue contre le Cancer, région Grand-Est (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est, CCIR-GE 2013, SP/SW n°214-2014).

References

- [1] C. He, D.J. Klionsky, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy, *Annual Review of Genetics* 43 (2009) 67–93. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910> 19653858.
- [2] E.A. Dunlop, A.R. Tee, mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy, *Seminars in Cell and Developmental Biology* 36C (2014) 121–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.006> 25158238.
- [3] H. Weidberg, E. Shvets, Z. Elazar, Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes, *Annual Review of Biochemistry* 80 (2011) 125–156. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-052709-094552> 21548784.
- [4] S. Pankiv, et al., p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *Journal of Biological Chemistry* 282 (33) (2007) 24131–24145. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M702824200> 17580304.
- [5] V. Kirkin, et al., A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates, *Molecular Cell* 33 (4) (2009) 505–516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020> 19250911.
- [6] A. Rozenknop, et al., Characterization of the interaction of GABARAPL-1 with the LIR motif of NBR1, *Journal of Molecular Biology* 410 (3) (2011) 477–487. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.05.003> 21620860.
- [7] I. Novak, et al., Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance, *EMBO Reports* 11 (1) (2010) 45–51. <http://dx.doi.org/10.1038/embo.2009.256> 20010802.
- [8] J.J. Lemasters, Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging, *Rejuvenation Research* 8 (1) (2005) 3–5. <http://dx.doi.org/10.1089/rej.2005.8.3> 15798367.
- [9] A.M. Choi, S.W. Ryter, B. Levine, Autophagy in human health and disease, *New England Journal of Medicine* 368 (19) (2013) 1845–1846. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1303158> 23656658.
- [10] E. White, Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer, *Nature Reviews Cancer* 12 (6) (2012) 401–410. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3262> 22534666.
- [11] Y. Ávalos, et al., Tumor suppression and promotion by autophagy, *BioMed Research International* 2014 (2014) 603980. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/603980> 25328887.
- [12] C.M. Kenific, J. Debnath, Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells, *Trends in Cell Biology* (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.09.001> 25278333.
- [13] D.R. Gough, T.G. Cotter, Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule, *Cell Death and Disease* 2 (2011) e213. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2011.96> 21975295.
- [14] C.E. Cross, et al., Oxygen radicals and human disease, *Annals of Internal Medicine* 107 (4) (1987) 526–545 3307585.
- [15] J. St-Pierre, et al., Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, *Journal of Biological Chemistry* 277 (47) (2002) 44784–44790. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M207217200> 12237311.
- [16] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochemistry Journal* 417 (1) (2009) 1–13. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081386> 19061483.
- [17] G. Poli, et al., Oxidative stress and cell signalling, *Current Med. Chem.* 11 (9) (2004) 1163–1182. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365323>.
- [18] J.P. Fruehauf, F.L. Meyskens Jr., Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical Cancer Research* 13 (3) (2007) 789–794. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2082> 17289868.
- [19] D.B. Vendramini-Costa, J.E. Carvalho, Molecular link mechanisms between inflammation and cancer, *Current Pharmaceutical Design* 18 (26) (2012) 3831–3852 22632748.
- [20] R. Scherz-Shouval, et al., Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4, *EMBO Journal* 26 (7) (2007) 1749–1760.
- [21] K. Inoki, T. Zhu, K.L. Guan, TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival, *Cell* 115 (5) (2003) 577–590.
- [22] D.M. Gwinn, et al., AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint, *Molecular Cell* 30 (2) (2008) 214–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003> 18439900.
- [23] J. Kim, et al., AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1, *Nature Cell Biology* 13 (2) (2011) 132–141. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152> 21258367.
- [24] D.F. Egan, et al., Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy, *Science* 331 (6016) (2011) 456–461. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1196371> 21205641.
- [25] D. Egan, et al., The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR, *Autophagy* 7 (6) (2011) 643–644 21460621.
- [26] S.L. Choi, et al., The regulation of AMP-activated protein kinase by H(2)O(2), *Biochemistry Biophysics Research Communication* 287 (1) (2001) 92–97. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5544> 11549258.
- [27] Y. Chen, et al., Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells, *Cell Death and Differentiation* 15 (1) (2008) 171–182. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402233> 17917680.
- [28] M. Djavaheri-Mergny, et al., NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy, *Journal of Biological Chemistry* 281 (41) (2006) 30373–30382. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M602097200> 16857678.
- [29] M. Boyer-Guittaut, et al., The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells, *Autophagy* 10 (6) (2014) 986–1003. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.28390> 24879149.
- [30] J. Debnath, The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16 (3) (2011) 173–187. <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-011-9223-3> 21779879.
- [31] E. Morselli, et al., Anti- and pro-tumor functions of autophagy, *Biochimica et*

- Biophysica Acta 1793 (9) (2009) 1524–1532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.006> 19371598.
- [32] J. Zhang, P.A. Ney, Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy, *Cell Death and Differentiation* 16 (7) (2009) 939–946. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.16> 19229244.
- [33] I. Novak, Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal, *Antioxidants and Redox Signaling* 17 (5) (2012) 794–802. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4407> 22077334.
- [34] D. Feng, et al., Molecular signaling toward mitophagy and its physiological significance, *Experimental Cell Research* 319 (12) (2013) 1697–1705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.03.034> 23603281.
- [35] R.J. Youle, D.P. Narendra, Mechanisms of mitophagy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (1) (2011) 9–14. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3208> 21179058.
- [36] R.L. Schweers, et al., NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49) (2007) 19500–19505. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708818104> 18048346.
- [37] H. Sandoval, et al., Essential role for nix in autophagic maturation of erythroid cells, *Nature* 454 (7201) (2008) 232–235. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07006> 18454133.
- [38] N. Matsuda, et al., PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *Journal of Cell Biology* 189 (2) (2010) 211–221.
- [39] E. Morselli, et al., Oncosuppressive functions of autophagy, *Antioxidants and Redox Signaling* 14 (11) (2011) 2251–2269. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3478> 20712403.
- [40] A. Takamura, et al., Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors, *Genes & Development* 25 (8) (2011) 795–800. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016211>.
- [41] R. Mathew, et al., Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability, *Genes & Development* 21 (11) (2007) 1367–1381. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1545107> 17510285.
- [42] V. Karantza-Wadsworth, et al., Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis, *Genes & Development* 21 (13) (2007) 1621–1635.
- [43] M. Komatsu, et al., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1, *Nature Cell Biology* 12 (3) (2010) 213–223. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2021> 20173742.
- [44] A. Lau, et al., A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62, *Molecular and Cellular Biology* 30 (13) (2010) 3275–3285. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00248-10> 20421418.
- [45] K. Taguchi, et al., Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (34) (2012) 13561–13566. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1121572109> 22872865.
- [46] N.F. Villeneuve, A. Lau, D.D. Zhang, Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases, *Antioxidants and Redox Signaling* 13 (11) (2010) 1699–1712. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3211> 20486766.
- [47] T. Sakurai, et al., Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis, *Cancer Cell* 14 (2) (2008) 156–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.06.016> 18691550.
- [48] C. Brenner, et al., Decoding cell death signals in liver inflammation, *Journal of Hepatology* 59 (3) (2013) 583–594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033> 23567086.
- [49] T. Saitoh, N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B.G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, S. Akira, Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production, *Nature* 456 (2008) 264–268. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07383> 18849965.
- [50] K. Bensaad, E.C. Cheung, K.H. Vousden, Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy, *EMBO Journal* 28 (19) (2009) 3015–3026. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.242> 19713938.
- [51] K. Nakahira, et al., Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome, *Nature Immunology* 12 (3) (2011) 222–230. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1980> 21151103.
- [52] R. Zhou, et al., A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation, *Nature* 469 (7329) (2011) 221–225. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09663> 21124315.
- [53] D. Roy, S. Sarkar, Q. Felty, Levels of IL-1beta control stimulatory/inhibitory growth of cancer cells, *Frontiers in Bioscience* 11 (2006) 889–898. <http://dx.doi.org/10.2741/1845> 16146780.
- [54] R. Kang, et al., HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clinical Cancer Research* 19 (15) (2013) 4046–4057. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0495> 23723299.
- [55] D. Tang, et al., High mobility group box 1 (HMGB1) activates an autophagic response to oxidative stress, *Antioxidants and Redox Signaling* 15 (8) (2011) 2185–2195.
- [56] D. Mittal, et al., TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells, *EMBO Journal* 29 (13) (2010) 2242–2252. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.94>.
- [57] R. Lock, et al., Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation, *Molecular Biology of the Cell* 22 (2) (2011) 165–178. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-06-0500> 21119005.
- [58] J.Y. Guo, et al., Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis, *Genes & Development* 25 (5) (2011) 460–470. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016311> 21317241.
- [59] S. Yang, et al., Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth, *Genes & Development* 25 (7) (2011) 717–729. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016111>.
- [60] M.J. Kim, et al., Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation, *Journal of Biological Chemistry* 286 (15) (2011) 12924–12932. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.138958> 21300795.
- [61] F. Weinberg, et al., Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19) (2010) 8788–8793. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1003428107> 20421486.
- [62] A.M. Strohecker, et al., Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors, *Cancer Discovery* 3 (11) (2013) 1272–1285. <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0397> 23965987.
- [63] J.Y. Guo, et al., Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis, *Genes & Development* 27 (13) (2013) 1447–1461. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.219642.113> 23824538.
- [64] K. Degenhardt, et al., Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis, *Cancer Cell* 10 (1) (2006) 51–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001> 16843265.
- [65] A. Duran, et al., The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis, *Cancer Cell* 13 (4) (2008) 343–354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001> 18394557.
- [66] R. Mathew, et al., Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62, *Cell* 137 (6) (2009) 1062–1075. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048> 19524509.
- [67] H. Wei, et al., Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis, *Genes & Development* 25 (14) (2011) 1510–1527. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2051011> 21764854.
- [68] A.L. Harris, Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth, *Nature Reviews Cancer* 2 (1) (2002) 38–47. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc704> 11902584.
- [69] M.C. Brahimi-Horn, G. Bellot, J. Pouyssegur, Hypoxia and energetic tumour metabolism, *Current Opinion in Genetics and Development* 21 (1) (2011) 67–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2010.10.006> 21074987.
- [70] N.S. Chandel, et al., Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing, *Journal of Biological Chemistry* 275 (33) (2000) 25130–25138. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M001914200>.
- [71] H. Zhang, et al., Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia, *Journal of Biological Chemistry* 283 (16) (2008) 10892–10903. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M800102200> 18281291.
- [72] G. Bellot, et al., Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains, *Molecular and Cellular Biology* 29 (10) (2009) 2570–2581. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00166-09> 19273585.
- [73] K.M. Rouschop, et al., Autophagy is required during cycling hypoxia to lower production of reactive oxygen species, *Radiotherapy and Oncology* 92 (3) (2009) 411–416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.029> 19616335.
- [74] N.M. Mazure, J. Pouyssegur, Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Current Opinion in Cell Biology* 22 (2) (2010) 177–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccb.2009.11.015> 20022734.
- [75] I. Papandreou, et al., Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L, *Cell Death and Differentiation* 15 (10) (2008) 1572–1581. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.84> 18551130.
- [76] K.M. Rouschop, et al., The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5, *Journal of Clinical Investigation* 120 (1) (2010) 127–141. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI40027> 20038797.
- [77] J.D. Rabinowitz, E. White, Autophagy and metabolism, *Science* 330 (6009) (2010) 1344–1348. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1193497> 21127245.
- [78] C.H. Eng, R.T. Abraham, The autophagy conundrum in cancer: influence of tumorigenic metabolic reprogramming, *Oncogene* 30 (47) (2011) 4687–4696. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.220> 21666712.
- [79] N. Sethi, Y. Kang, Unravelling the complexity of metastasis – molecular understanding and targeted therapies, *Nature Reviews Cancer* 11 (10) (2011) 735–748. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3125> 21941285.
- [80] S. Valastyan, R.A. Weinberg, Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, *Cell* 147 (2) (2011) 275–292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024> 22000009.
- [81] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (3) (2014) 178–196. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3758> 24556840.
- [82] R. Lazova, R.L. Camp, V. Klump, S.F. Siddiqui, R.K. Amaravadi, J.M. Pawelek, Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome, *Clinical Cancer Research* 18 (2012) 370–379. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1282> 22080440.

- [83] X.H. Ma, et al., Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma, *Clinical Cancer Research* 17 (10) (2011) 3478–3489. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2372> 21325076.
- [84] P. Friedl, S. Alexander, Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity, *Cell* 147 (5) (2011) 992–1009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016> 22118458.
- [85] N. Reymond, B.B. d'Agua, A.J. Ridley, Crossing the endothelial barrier during metastasis, *Nature Reviews Cancer* 13 (12) (2013) 858–870.
- [86] C. Fung, et al., Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival, *Biochimica et Biophysica Acta* 19 (3) (2008) 797–806. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1092> 18094039.
- [87] P. Paoli, E. Giannoni, P. Chiarugi, Anoinis molecular pathways and its role in cancer progression, *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (12) (2013) 3481–3498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026> 23830918.
- [88] Y.F. Peng, et al., Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells, *Autophagy* 9 (12) (2013) 2056–2068. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.26398> 24157892.
- [89] A. Avivar-Valderas, et al., Regulation of autophagy during ECM detachment is linked to a selective inhibition of mTORC1 by PERK, *Oncogene* 32 (41) (2013) 4932–4940. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.512> 23160380.
- [90] C.L. Buchheit, R.R. Rayavarapu, Z.T. Schafer, The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment, *Seminars in Cell and Developmental Biology* 23 (4) (2012) 402–411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.04.007> 22579674.
- [91] A. Avivar-Valderas, et al., PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment, *Molecular and Cellular Biology* 31 (17) (2011) 3616–3629. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.05164-11>.
- [92] R.L. Macintosh, et al., Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model, *Cell Cycle* 11 (10) (2012) 2022–2029.
- [93] S. Galavotti, et al., The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells, *Oncogene* 32 (6) (2013) 699–712. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.111> 22525272.
- [94] J. Li, et al., Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition, *Carcinogenesis* 34 (6) (2013) 1343–1351. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgt063> 23430956.
- [95] C.M. Kenific, A. Thorburn, J. Debnath, Autophagy and metastasis: another double-edged sword, *Current Opinion in Cell Biology* 22 (2) (2010) 241–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.10.008> 19945838.
- [96] D.G. DeNardo, M. Johansson, L.M. Coussens, Immune cells as mediators of solid tumor metastasis, *Cancer and Metastasis Reviews* 27 (1) (2008) 11–18. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-007-9100-0> 18066650.
- [97] T.D. Tlsty, L.M. Coussens, Tumor stroma and regulation of cancer development, *Annual Review of Pathology* 1 (2006) 119–150. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224> 18039110.
- [98] Q. Lv, W. Wang, J. Xue, F. Hua, R. Mu, H. Lin, J. Yan, X. Lv, X. Chen, Z.W. Hu, DEDD interacts with PI3K3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer, *Cancer Research* 72 (2012) 3238–3250. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3832> 22719072.
- [99] M.C. Wang, et al., In vitro synergistic antitumor efficacy of sequentially combined chemotherapy/icitinib in non-small cell lung cancer cell lines, *Oncology Reports* 33 (1) (2015) 239–249. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2014.3583> 25370413.
- [100] P. Carmeliet, R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* 407 (6801) (2000) 249–257. <http://dx.doi.org/10.1038/35025220> 11001068.
- [101] T.M. Nguyen, et al., Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells, *Blood* 109 (11) (2007) 4793–4802. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-11-059352> 17272502.
- [102] S. Ramakrishnan, et al., Autophagy and angiogenesis inhibition, *Autophagy* 3 (5) (2007) 512–515. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.4734> 17643071.
- [103] W. Shen, et al., Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells, *Free Radical Biology and Medicine* 55 (2013) 73–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.011> 23195684.
- [104] R. Kalluri, M. Zeisberg, Fibroblasts in cancer, *Nature Reviews Cancer* 6 (5) (2006) 392–401. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1877> 16572188.
- [105] H. Maes, et al., Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response, *Trends in Molecular Medicine* 19 (7) (2013) 428–446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.005> 23714574.
- [106] U.E. Martinez-Outschoorn, et al., The autophagic tumor stroma model of cancer or “battery-operated tumor growth”: a simple solution to the autophagy paradox, *Cell Cycle* 9 (21) (2010) 4297–4306.
- [107] U.E. Martinez-Outschoorn, et al., Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: a new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells, *Cell Cycle* 9 (16) (2010) 3256–3276. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.16.12553> 20814239.
- [108] S. Pavlides, et al., The autophagic tumor stroma model of cancer: role of oxidative stress and ketone production in fueling tumor cell metabolism, *Cell Cycle* 9 (17) (2010) 3485–3505.
- [109] U.E. Martinez-Outschoorn, et al., Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator, *Cell Cycle* 10 (11) (2011) 1784–1793. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11021> 21566463.
- [110] F. Sotgia, et al., Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms, *Annual Review of Pathology* 7 (2012) 423–467. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-120856> 22077552.
- [111] U.E. Martinez-Outschoorn, et al., Stromal–epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (7) (2011) 1045–1051. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.023>.
- [112] K. Bensaad, et al., TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis, *Cell* 126 (1) (2006) 107–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036> 16839880.
- [113] M.P. Lisanti, et al., Understanding the “lethal” drivers of tumor-stroma co-evolution: emerging role(s) for hypoxia, oxidative stress and autophagy/mitophagy in the tumor micro-environment, *Cancer Biology & Therapy* 10 (6) (2010) 537–542.
- [114] X. Zhao, Y. He, H. Chen, Autophagic tumor stroma: mechanisms and roles in tumor growth and progression, *International Journal of Cancer* 132 (1) (2013) 1–8. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27664> 22684793.
- [115] S. Pavlides, et al., Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis, *Antioxidants and Redox Signaling* 16 (11) (2012) 1264–1284. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4243> 21883043.
- [116] U.E. Martinez-Outschoorn, et al., Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: role of hypoxia, HIF1 induction and NFkappaB activation in the tumor stromal microenvironment, *Cell Cycle* 9 (17) (2010) 3515–3533.
- [117] G. Bonuccelli, et al., Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism, *Cell Cycle* 9 (17) (2010) 3506–3514.
- [118] R.V. Iozzo, Autophagic tumor stroma: a biofuel for cancer growth, *Cell Cycle* 10 (19) (2011) 3231–3232. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.19.17124> 21946523.
- [119] R. Castello-Cros, et al., Matrix remodeling stimulates stromal autophagy, “fueling” cancer cell mitochondrial metabolism and metastasis, *Cell Cycle* 10 (20) (2011) 2021–2034. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.12.16002> 21646868.
- [120] F. Sotgia, et al., Mitochondria “fuel” breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells, *Cell Cycle* 11 (23) (2012) 4390–4401. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.22777>.
- [121] J.S. Carew, K.R. Kelly, S.T. Nawrocki, Autophagy as a target for cancer therapy: new developments, *Cancer Management and Research* 4 (2012) 357–365. <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S26133> 23091399.
- [122] H. Zhou, et al., Cyclopirox induces autophagy through reactive oxygen species-mediated activation of JNK signaling pathway, *Oncotarget* 5 (2014) 10140–10150. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.4243> 25294812.
- [123] E.R. Hahm, K. Sakao, S.V. Singh, Honokiol activates reactive oxygen species-mediated cytoprotective autophagy in human prostate cancer cells, *Prostate* 74 (12) (2014) 1209–1221. <http://dx.doi.org/10.1002/pros.22837> 25043291.
- [124] Y. Gonzalez, et al., Atg7- and Keap1-dependent autophagy protects breast cancer cell lines against mitochonine-induced oxidative stress, *Oncotarget* 5 (6) (2014) 1526–1537. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.4243> 24681637.
- [125] H. Kim, et al., Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013 (2013) 596496. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/596496> 24379902.
- [126] Q. Zhang, et al., Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells, *Genes Cancer* 5 (3–4) (2014) 100–112. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/596496> 25053988.
- [127] Y. Al Dhaheri, et al., Carnosol induces ROS-Mediated Beclin1-Independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer, *PLOS One* 9 (10) (2014) e109630. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109630> 25299698.
- [128] W. Hao, et al., Psoralidin induces autophagy through ROS generation which inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cells, *PeerJ* 2 (2014) e555. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.555> 25250213.
- [129] H. Miki, et al., Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells, *International Journal of Oncology* 40 (4) (2012) 1020–1028. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1325> 22218562.
- [130] C.C. Winterbourn, The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2) (2014) 730–738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.004> 23665586.
- [131] J.D. La Favor, E.J. Anderson, R.C. Hickner, Novel method for detection of reactive oxygen species in vivo in human skeletal muscle, *Physiological Research* 63 (3) (2014) 387–392. <http://dx.doi.org/10.1002/pros.22837> 24564604.
- [132] S. Mrakic-Sposta, et al., Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012 (2012) 973927. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/973927> 22900129.
- [133] L.J. Roberts, K.P. Moore, W.E. Zacker, J.A. Oates, J.D. Morrow, Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2alpha in humans, *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 20617–20620. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.34.20617> 8702808.
- [134] G. Smith, Q.D. Nguyen, E.O. Aboagye, Translational imaging of apoptosis, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9 (9) (2009) 958–967. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/973927> 19663785.
- [135] D.J. Klionsky, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy* 8 (4) (2012) 445–544.

Liste des communications orales

- **Poillet-Perez L.**, Gauthier T., Hervouet E., Fraichard A., Borg C., Pallandre J.R., Gonzalez B.J., Ramdani Y., Boyer-Guittaut M., Delage-Mourroux R., Despouy G. Les fonctions suppresseur de tumeur de GABARAPL1 sont indépendantes de sa liaison aux autophagosomes. *Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, Juin 2015.*

- **Poillet-Perez L.**, Gauthier T., Hervouet E., Fraichard A., Borg C., Pallandre J.R., Gonzalez B.J., Ramdani Y., Boyer-Guittaut M., Delage-Mourroux R., Despouy G. Les fonctions suppresseur de tumeur de GABARAPL1 sont indépendantes de sa liaison aux autophagosomes. *Journée Scientifique de la SFR FED4234, Besançon, Avril 2015.*

- **Poillet –Perez L.**, Gauthier T., Fraichard A., Hervouet E., Boyer-Guittaut M., Jouvenot M., Delage-Mourroux R., Despouy G. La liaison de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes est nécessaire à son rôle suppresseur de tumeur. *Société de Biologie de Besançon, 1^{er} Prix de communication orale, Décembre 2014.*

- **Poillet –Perez L.**, Gauthier T., Fraichard A., Hervouet E., Boyer-Guittaut M., Jouvenot M., Delage-Mourroux R., Despouy G. Etude de l'implication de l'autophagie dans les fonctions de GABARAPL1 liées aux cellules cancéreuses. *Journée Scientifique de la SFR FED4234, Besançon, Mai 2014.*

- Boyer-Guittaut M., **Poillet L.**, Liang Q., Bôle-Richard E., Ouyang X., Benavides G.A., Chakrama F.Z., Fraichard A., Darley-USmar V.M., Despouy G., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Zhang J. Rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie et l'intégrité mitochondriale des cellules de cancer du sein. *Société de biologie de besançon, Décembre 2013.*

- **Poillet L.**, Pernodet N., Boyer-Guittaut M., Adami P., Borg C., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Despouy G. QSOX1 inhibits autophagic flux in breast cancer cells. *3^{èmes} Journées Scientifiques du CFATG, Grasse, Septembre 2013.*

- **Poillet L.**, Pernodet N., Boyer-Guittaut M., Adami P., Borg C., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Despouy G. Etude du rôle de QSOX1 dans l'autophagie des cellules de cancer du sein. *Journée Scientifique de la SFR FED4234, Besançon, Mai 2013.*

Liste des communications affichées

- **Poillet-Perez L.**, Gauthier T., Hervouet E., Fraichard A., Borg C., Pallandre J.R., Gonzalez B.J., Ramdani Y., Boyer-Guittaut M., Delage-Mourroux R., Despouy G. GABARAPL1 mediated-tumor suppressive functions are independent of its conjugation to the autophagosome. *EMBO conference, Chia (Italie), Septembre 2015. (Poster 1)*

- **Poillet –Perez L.**, Gauthier T., Fraichard A., Hervouet E., Boyer-Guittaut M., Jouvenot M., Delage-Mourroux R., Despouy G. GABARAPL1 functions in breast cancer cells are linked to autophagy ? *First joint meeting of Nordic, Spanish and French autophagy networks, Toulouse, Septembre 2014. (Poster 2)*

- Boyer-Guittaut M., **Poillet L.**, Liang Q., Bôle-Richard E., Ouyang X., Benavides G.A., Chakrama F.Z., Fraichard A., Darley-USmar V.M., Despouy G., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Zhang J. The role of GABARAPL1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *3^{èmes} Journées Scientifiques du CFATG, Grasse, Septembre 2013. (Poster 3)*

- **Poillet L.**, Pernodet N., Boyer-Guittaut M., Adami P., Borg C., Jouvenot M., Delage-Mourroux R. and Despouy G. Etude du rôle de QSOX1 dans l'autophagie des cellules de cancer du sein. *Forum des jeunes chercheurs, Dijon, Juin 2013. (Poster 4)*

POSTER N°1

Poillet-Perez L., Gauthier T., Hervouet E., Fraichard A., Borg C., Pallandre J.R.,
Gonzalez B.J., Ramdani Y., Boyer-Guittaut M., Delage-Mourroux R., Despouy G.

EMBO conference, Chia (Italie)

Septembre 2015

GABARAPL1 mediated-tumor suppressive functions are independent of its conjugation to autophagosomes

Poillet-Perez L.¹, Gauthier T.¹, Hervouet E.¹, Fraichard A.¹, Borg C.², Pallandre J.R.², Gonzales B.³, Ramdani Y.³, Boyer-Guittaut M.¹, Delage-Mourroux J.¹, Despoux G.¹

¹ Université de Franche-Comté, EA3922 « Estrogènes, Expression Génétique et Pathologies du Système Nerveux Central », SFR FED 4234, U.F.R. Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France.
² Université de Franche-Comté, Inserm UMR 1098 « Relation Hôte Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génétique », 240 route de Dôle, 25000 Besançon, France.
³ Université de Rouen, Inserm E.R.I 28 Néovasc « Endothélium microvasculaire et lésions cérébrales néonatales », UFR de Médecine et de Pharmacie, 22 boulevard Gambetta 76183 Rouen, France.

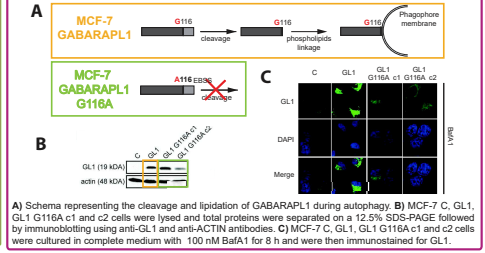
Introduction

- GABARAPL1 (GL1) is a protein of 117 amino-acids, member of the ATG8 family and GABARAP subfamily
- GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles after cleavage of its C-terminal glycine (G116)
- Extinction of GABARAPL1 inhibits autophagic flux and lysosomal number in breast cancer cells
- GABARAPL1 expression is reduced in cancer cells compared to normal tissues
- GABARAPL1 inhibits cancer cell phenotypes *in vitro* and tumor growth *in vivo*.

Purpose: i) Characterize the role of GABARAPL1 during early and late stage of autophagy
 ii) Determine the involvement of GABARAPL1 conjugation to autophagosomes in its tumor suppressive functions

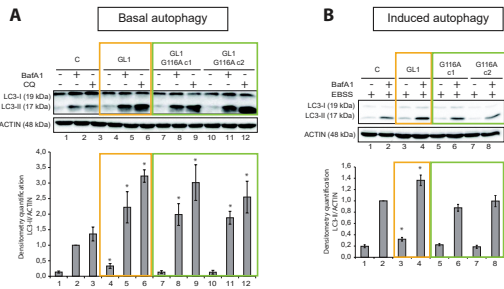
Methods: Breast cancer cells models: MCF-7 GABARAPL1 or MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 et c2

Breast cancer cell models :



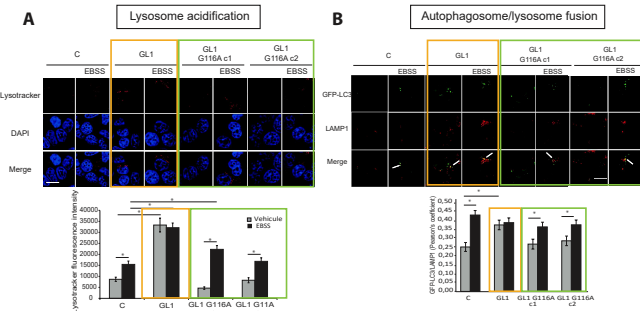
AUTOPHAGY MECHANISMS

1 G116A mutation impairs the effect of GABARAPL1 on induced but not basal autophagy



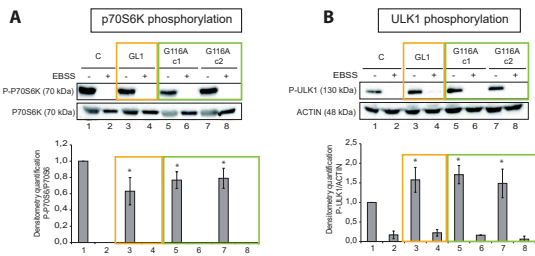
A) MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium with or without 100 nM Baflomycin A1 (BafA1) or 40 μM Chloroquine (CQ) for 2h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μl were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-LC3 and anti-ACTIN antibodies. LC3-II levels were quantified using the Image Lab software. *P < 0.05 compared to the associated control (t-test). **B)** MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in EBSS for 4h with or without 100 nM BafA1 for 2h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μl were separated on a 12.5% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-LC3 and anti-ACTIN antibodies. LC3-II levels were quantified using the Image Lab software. *P < 0.05 compared to the associated control (t-test).

2 G116A mutation impair the effect of GABARAPL1 on late stage of autophagy



A) MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h and with 500 nM LysoTracker Red for the last 1h. LysoTracker-stained acidic vesicles were quantified using a confocal microscope and the Blobfinder software. *P < 0.05 compared to the control (t-test). **B)** MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were transfected with the pGFP-LC3 vector. 24h after transfection, cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h and were then immunostained for LAMP1. Colocalization of the autophagosome marker GFP-LC3 and the lysosomal marker LAMP1 was analyzed using a confocal microscope and the Pearson's coefficient using ImageJ software. *P < 0.05 compared to the control (t-test).

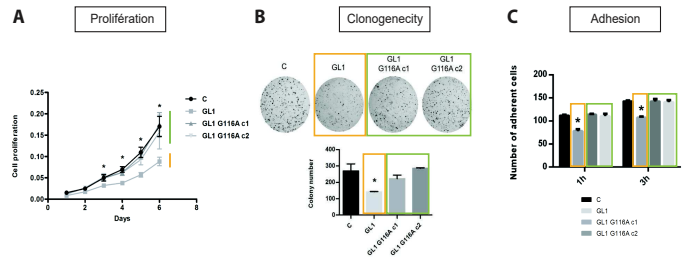
3 G116A mutation doesn't impair the effect of GABARAPL1 on early stage of autophagy



A-B) MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were cultured in complete medium or EBSS for 4h. Cells were then lysed in SB1X and 30 μl were separated on a 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-P70S6K and anti-P70S6K antibodies (**A**) or anti-P-ULK1 and anti-ACTIN antibodies (**B**). Protein levels were quantified using the Image Lab software. *P < 0.05 compared to the control (t-test).

CANCER CELL PHENOTYPES

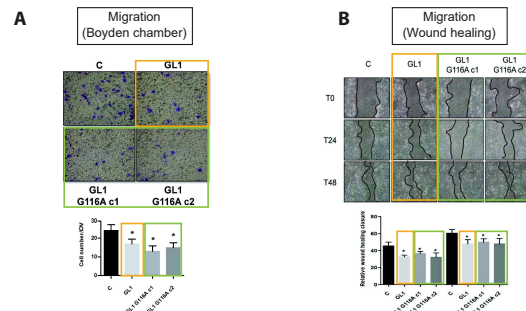
4 G116A mutation modifies the effect of GABARAPL1 on some cancer cell phenotype *in vitro*



Same results were obtained for invasion, aggregation and anchorage independent cell proliferation

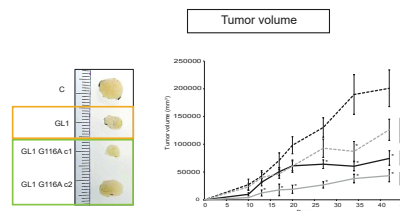
A) Growth rate of MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells using MTT assay. *P < 0.05 compared to the control (t-test). **B)** Clonogenic assay for MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells. 2000 cells were plated in a 6-well plate and 15 days later, cells were fixed and stained with 2% crystal violet. The colony numbers were evaluated by counting using Vision Capt software. *P < 0.05 compared to the control (t-test). **C)** MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were plated in 24-well plate in serum-free medium for 1 and 3h. Adherent cells were then collected and counted. *P < 0.05 compared to the control (t-test).

5 G116A mutation doesn't modify the effect of GABARAPL1 on migration *in vitro*



A) MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were seeded on polycarbonate filters and incubated for 24h. Inserts were then stained with a 2% crystal violet solution and photographed to study cell migration. *P < 0.05 compared to the control (t-test). **B)** MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were plated in 6-well plate and wound was performed after confluence. Migration was assessed after 24 and 48h. The wound area was quantified using ImageJ software. *P < 0.05 compared to the control (t-test).

6 G116A mutation doesn't modify the effect of GABARAPL1 on tumor growth *in vivo*



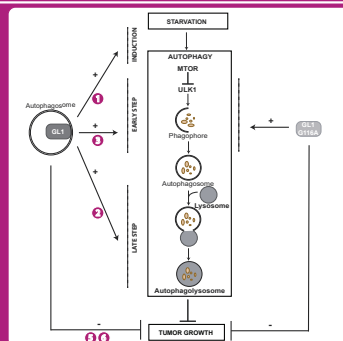
MCF-7 C, GL1, GL1 G116A c1 and c2 cells were injected subcutaneously in Rag1/2 mice (n = 12 per group). One week prior to cell inoculation and until the end of the experiment, estrogen were administered at 1 μg/ml in drinking water. 13 days after injection, the evolution of the tumor volume was measured twice a week. The tumor volume was calculated using the formula: V = 1/2 × a × b², where a is the longest tumor axis, and b is the shortest tumor axis. 42 days after injection, tumors were fixed in formal and photographed. *P < 0.05, compared to the control (t-test).

Conclusions

Our data allow us to show that G116A mutation:

- Increases basal autophagy flux but not induced autophagy
- Impairs the effect of GABARAPL1 on late stage of autophagy but did not modify its function on early stage
- Inhibited the effect of GABARAPL1 on several cancer cell phenotypes *in vitro* but did not alter its effect on tumor growth *in vivo*.

GABARAPL1 present different regulatory functions during early and late stages of autophagy independently or not of its conjugation to autophagosomes but its tumor suppressive function appeared independent of its conjugation.



POSTER N°2

Poillet –Perez L., Gauthier T., Fraichard A., Hervouet E., Boyer-Guittaut M., Jouvenot M., Delage-Mourroux R., Despouy G.

*First joint meeting of Nordic, Spanish and French autophagy networks, Toulouse,
Septembre 2014*

GABARAPL1 functions in breast cancer cells are linked to autophagy?

Laura Poillet-Perez¹, Thierry Gautier¹, Annick Fraichard¹, Eric Hervouet¹, Michaël Boyer-Guittaut¹, Michèle Jouvenot¹, Régis Delage-Mourroux¹ and Gilles Despoux¹

¹ Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922 Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, SFR FED4234, UFR Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France.

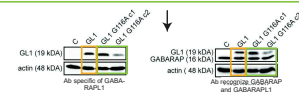
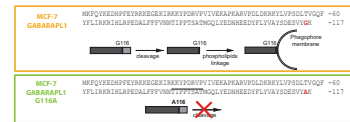
Introduction

- GABARAPL1 (GL1) is a protein of 117 amino-acids, member of the GABARAP family
- GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles after cleavage of its C-terminal glycine
- Extinction of GABARAPL1 inhibits autophagic flux and lysosomal number in breast cancer cells
- GABARAPL1 expression is reduced in cancer cells compared to normal tissues
- GABARAPL1 inhibits cancer cell phenotypes *in vitro* and tumor growth *in vivo*.

Purpose: Determine the involvement of autophagy in GABARAPL1 functions related to cancer cells

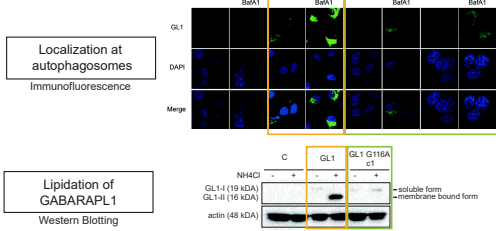
Methods: Breast cancer cells models: **MCF-7 GABARAPL1** or **MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 et c2**

Cellular models :

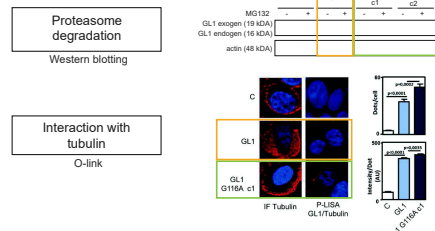


Characterization of MCF-7 overexpressing GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A

G116A mutation impairs association of GABARAPL1 with autophagosomes

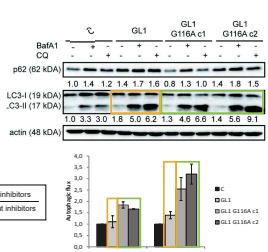


G116A mutation doesn't impair other characteristics of GABARAPL1

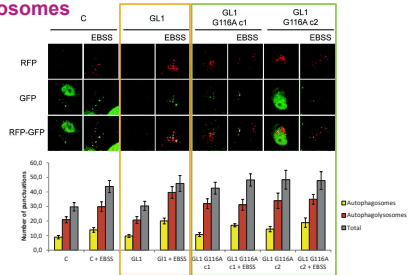


Effect of GABARAPL1 G116A on autophagy

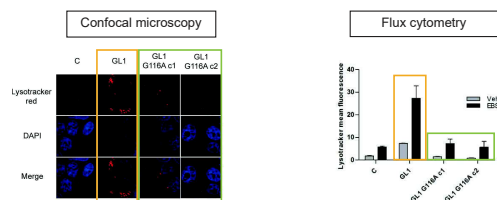
G116A mutation increases autophagic flux



G116A mutation increases number of autophagosomes and autophagolysosomes



G116A mutation inhibits lysosomal activity

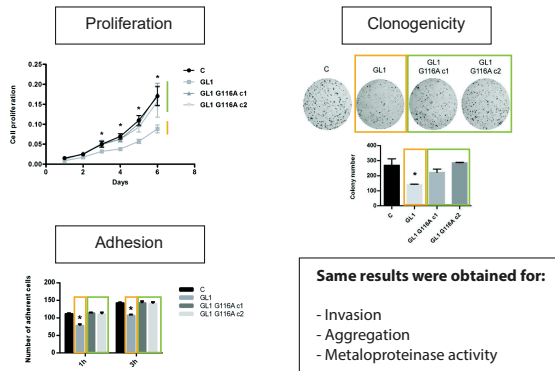


G116A mutation doesn't modify lysosomal number

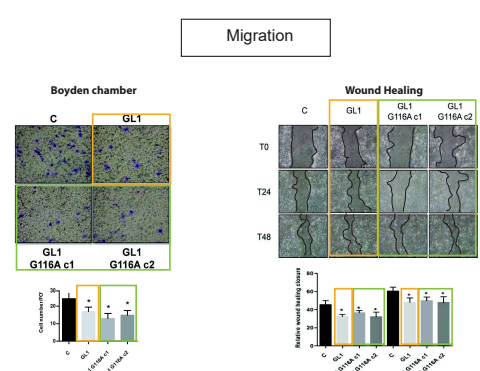


Effect of GABARAPL1 G116A on cancer cell phenotypes

G116A mutation cancels out the effect of GABARAPL1 on cancer cells phenotypes



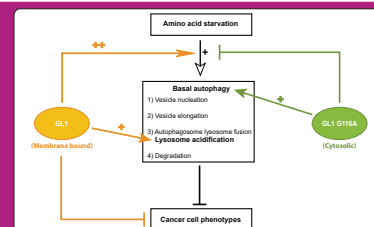
G116A mutation doesn't modify the effect of GABARAPL1 on migration



Conclusions

Our data allow us to show that G116A mutation:

- Impairs the association of GABARAPL1 with autophagosomes
 - Increases basal autophagic flux but impairs autophagy induced following starvation
 - Impairs the effect of GABARAPL1 on lysosomal activity without modifying lysosomal number
 - Impairs the effect of GABARAPL1 on cancer cell phenotypes
 - Doesn't modify the effect of GABARAPL1 on cell migration
- Depends on its localization
- Independent on its localization



Thanks to :
EFATG
Franche-Comté Cancer Institute

POSTER N°3

Boyer-Guittaut M., **Poillet L.**, Liang Q., Bôle-Richard E., Ouyang X., Benavides G.A.,
Chakrama F.Z., Fraichard A., Darley-Usmar V.M., Despouy G., Jouvenot M., Delage-
Mourroux R. and Zhang J.

*3^{èmes} Journées Scientifiques du CFATG, Grasse
Septembre 2013*

The role of GABARAPL1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells

Michaël Boyer-Guittaut^{1,2,3}, Laura Poillet¹, Qiuli Liang^{2,3}, Elodie Bôle-Richard¹, Xiaosen Ouyang^{2,3,4}, Gloria A. Benavides^{2,3}, Fatima-Zahra Chakrama¹, Annick Fraichard¹, Victor M. Darley-Usmar^{2,3}, Gilles Despouy¹, Michèle Jouvenot¹, Régis Delage-Mourroux¹ and Jianhua Zhang^{2,3,4}

1Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922 Estrogènes, Expression Génétique et Pathologies du Système Nerveux Central, SFR IBCT FED4234, Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France. 2Department of Pathology, 3Center for Free Radical Biology, University of Alabama at Birmingham, 4Department of Veterans Affairs, Birmingham VA Medical Center, 901 19th Street South, Birmingham, AL 35294, USA.

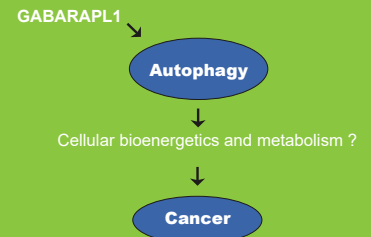
E-mail: gilles.despouy@univ-fcomte.fr

Introduction

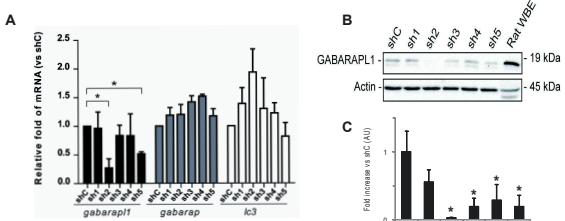
- GABARAPL1 = protein of 117 amino-acids, member of the GABARAP family (GABAA receptor associated-protein).
- GABARAPL1 interacts, like GABARAP, with the $\gamma 2$ subunit of GABAA receptor and cytoskeleton elements.
- GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles and, particularly, involved in the elongation of autophagosomes.
- A high GABARAPL1 expression is associated with a better outcome for patients presenting lymph node positive breast tumors, and overexpression of GABARAPL1 inhibits breast cancer cell proliferation and the formation of tumors in nude mice.

Hypothesis

GABARAPL1 involvement in autophagy plays an important role in regulating cellular bioenergetics and metabolism which could explain its impact on breast cancer cell.

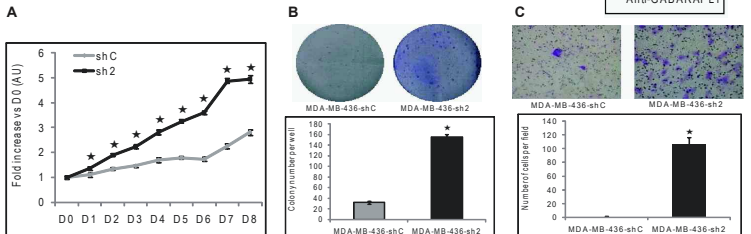


1 Establishment of GABARAPL1 knock-down stable cell lines



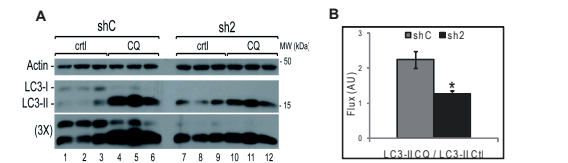
(A) GABARAPL1, GABARAP and LC3B mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in the different MDA-MB-436 stable cell lines. (B) GABARAPL1 expression levels in the MDA-MB-436 stable cell lines were determined by western blotting. (C) Quantification of the signals observed on the western blot in B.

2 GABARAPL1 regulates MDA-MB-436 proliferation, colony formation ability and cell invasion



(A) MDA-MB-436-shC and sh2 cell growth was determined using a MTT assay over an 8-day period. (B) MDA-MB-436-shC and sh2 cells (3,000 in 6-well plates) were grown for a period of 12 days then fixed and stained with crystal violet. The number of colonies was then determined using the Vision-Capt software (Vibier Loumat). (C) MDA-MB-436-shC and sh2 cells were grown in modified Boyden chambers coated with ECM gel. After a 24 h incubation at 37°C, cells in the upper chamber were swabbed while cells in the lower chamber were fixed, stained with crystal violet and counted using a light microscope at a high magnification (x400).

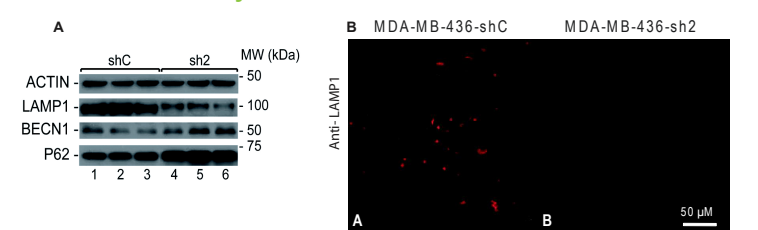
3 GABARAPL1 knock-down inhibits autophagic flux



(A) MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 5 h in the presence (lanes 4-6 and 10-12) or absence (lanes 1-3 and 7-9) of the lysosome inhibitor chloroquine (40 μ M). Total proteins (25 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-LC3 and anti-Actin antibodies and the ECL Plus reagent. (B) The autophagy flux was determined as the levels of LC3-II in the presence of chloroquine divided by the levels of LC3-I in absence of chloroquine.

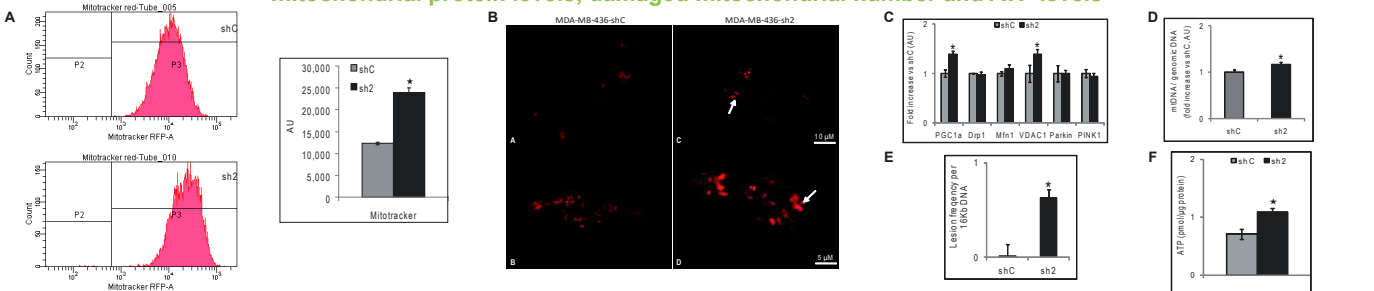
GABARAPL1 knock-down also increases p62 mRNA, as well as p62, BECN1 and cathepsin D protein levels

3 GABARAPL1 knock-down decreases LAMP1 levels and lysosomal number



(A) MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 24 h at 37°C and 5% CO₂ then total proteins (25 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-LAMP1, anti-Becn1, anti-p62 and anti-Actin antibodies and the ECL Plus reagent. (B) MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured for 24 h at 37°C and 5% CO₂, fixed, permeabilized, blocked with 5% BSA, incubated with a monoclonal anti-mouse LAMP1 overnight at 4°C and finally with an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse for 1 h. The cells were then analyzed using a confocal microscope.

4 GABARAPL1 knock-down increases mitochondrial membrane potential, alters mitochondrial morphology and increases mitochondrial protein levels, damaged mitochondrial number and ATP levels



(A) Flow cytometer window captures and histograms showing Mitotracker red fluorescence values (AU) for the two cell lines shC and sh2. (B) MDA-MB436-shC and sh2 cells (100,000) were cultured in Labtek 4-well plates for 24 h and stained with 50 nM Mitotracker red for 45 min and washed with PBS. Mitochondria morphology was observed using the Zeiss LSM 710 confocal microscope and the Zen 2008 software. (C) Quantification of the signals observed on the western blot. (D-E) MDA-MB436-shC and sh2 cells were cultured in 6-well plates for 24 h. Cells were washed with PBS and kept frozen at -80°C until purification of total DNA. (D) Specific genomic and mitochondrial DNA sequences were amplified by quantitative real-time PCR. The data are presented as the ratio of mitochondrial PCR product versus genomic DNA and normalized to the control cell line, shC. (E) Specific long and short mitochondrial DNA sequences were amplified by PCR. The data are presented as the ratio of levels of decrease of long mitochondrial PCR product versus levels of short mitochondrial PCR product and normalized to the control cell line shC. (F) Histogram showing intracellular ATP values (pmoles/ μ g protein) for the two cell lines shC and sh2. MDA-MB436-shC and sh2 cells (40,000) were cultured in 96-well plates for 24 h.

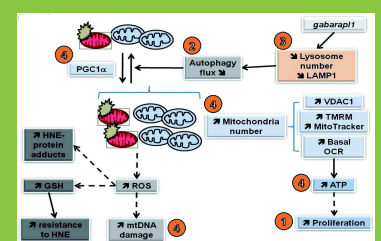
Conclusions

Our data allow us to propose the following model :

GABARAPL1 inhibition would induce a disruption of the autophagy-lysosome pathway leading to a decrease lysosomal number therefore leading to an accumulation of damaged mitochondria. This is associated with increased bioenergetic function and ATP levels.

The increase of mitochondrial number and cellular glutathione, which itself could be stimulated by an increase in the basal levels of mitochondrial reactive oxygen species, would further result in resistance to apoptosis, and increased proliferation rate and aggressiveness of these cells.

Our data demonstrate that GABARAPL1 plays an important role in regulating the autophagy - lysosome pathway and, as a consequence, mitochondrial activity, breast cancer cells metabolism and aggressiveness.



POSTER N°4

**Poillet L., Pernodet N., Boyer-Guittaut M., Adami P., Borg C., Jouvenot M., Delage-
Mourroux R. and Despouy G.**

Forum des jeunes chercheurs, Dijon

Juin 2013

Etude du rôle de QSOX1 dans l'autophagie des cellules de cancer du sein

Poillet L.¹, Penodet N.¹, Boyer-Guittaut M.¹, Adami P.¹, Borg C.², Jouvenot M.¹, Delage-Mourroux R.¹, Despouy G.¹

¹ EA3922 "Estrogènes, expression génique et pathologies du système nerveux central"

² Inserm UMR 1098 "Relation hôte greffon et ingénierie cellulaire et génique"

Introduction

La protéine QSOX1 (Quiescin Sulfhydryl Oxydase 1) est responsable de la formation de ponts disulfures et participe ainsi au repliement et à la stabilité des protéines. QSOX1 est également associée aux processus tumoraux et à la protection contre les stress cellulaires. De récents résultats du laboratoire ont montré que QSOX1 réduit la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein *in vitro* et réduit le développement tumoral *in vivo*. De plus, l'expression de QSOX1 est induite par différents stress et cette protéine protège les cellules contre la mort induite par ces stress.

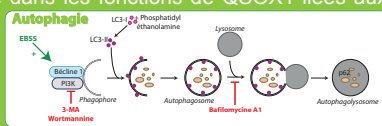
Objectifs

- 1 Régulation de QSOX1 lors de l'induction de l'autophagie
- 2 Rôle de QSOX1 dans l'autophagie
- 3 Implication de l'autophagie dans les fonctions de QSOX1 liées aux cellules cancéreuses

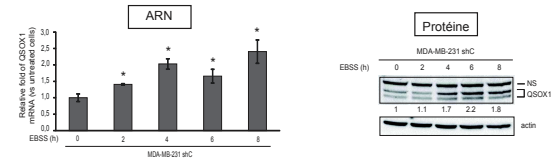
Modèles cellulaires

Cellules de cancer du sein :

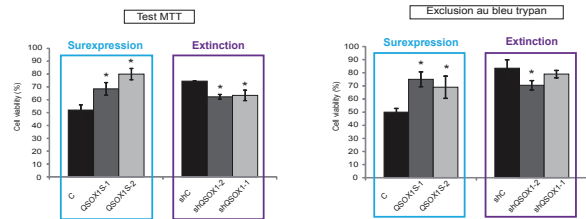
- Modèle surexpression de QSOX1 → MCF7
- Modèle d'extinction de QSOX1 → MDA-MB-231



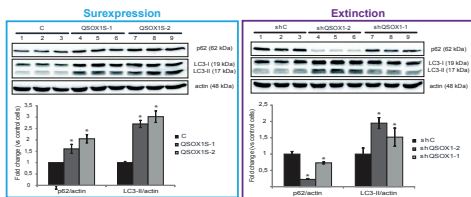
1 • L'expression de QSOX1 augmente lors de l'induction de l'autophagie



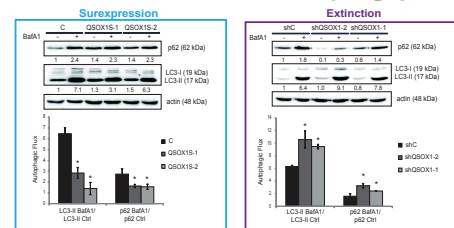
• QSOX1 protège contre la mort induite par une carence en acide aminé



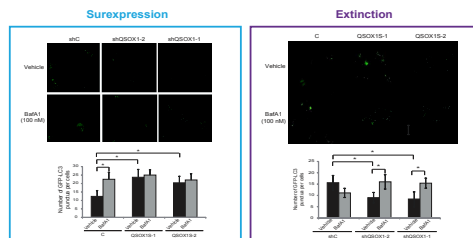
2 • QSOX1 régule le taux des marqueurs de l'autophagie: p62 et LC3-II



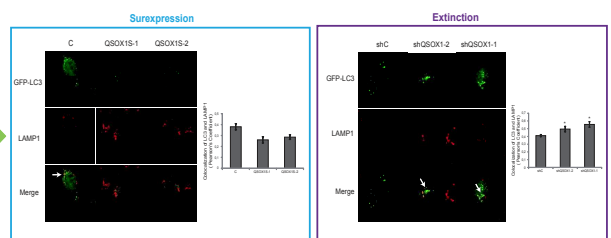
• QSOX1 inhibe le flux autophagique



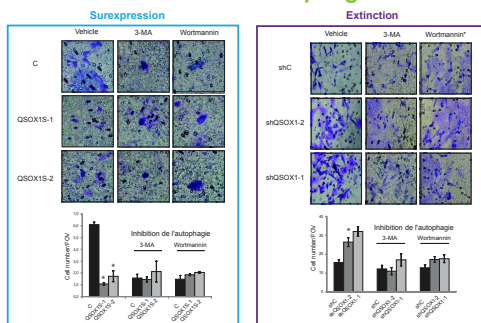
• QSOX1 inhibe les étapes tardives de l'autophagie



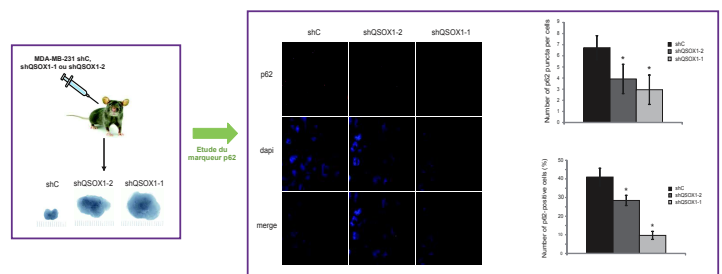
• QSOX1 inhibe la fusion autophagosome/lysosome



3 • QSOX1 pourrait réduire l'invasion cellulaire en inhibant l'autophagie

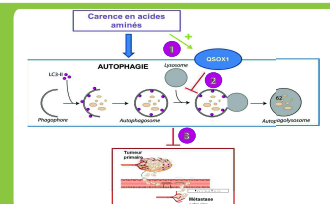


• Les fonctions de QSOX1 dans la croissance tumorale pourraient être liées à son rôle dans l'autophagie



Conclusions

- L'expression de QSOX1 est induite par une carence en acide aminé et cette protéine protège les cellules contre la mort induite par ce stress
- QSOX1 inhibe l'autophagie en inhibant la fusion autophagosome/lysosome
- Les fonctions de QSOX1 dans l'invasion cellulaire et la croissance tumorale semble liées à son rôle dans l'autophagie



The aim of my thesis was to study the involvement of autophagy in cancer using two model proteins, QSOX1 and GABARAPL1.

QSOX1 is present in the cells under two major protein isoforms, QSOX1-S and QSOX1-L. This protein has been shown to be involved in the regulation of protein folding and stability through the formation of disulfide bonds. We previously showed in our laboratory that QSOX1-S is associated with protection against cellular stress and cancer. Indeed; QSOX1-S expression is induced following oxidative or endoplasmic reticulum stress and protects cells against stress-induced cell death. Moreover, QSOX1-S is able to inhibit cancer cell phenotypes *in vitro* as well as tumor growth *in vivo*. However, the role of QSOX1 in cancer is complex because of the existence of its different transcripts and that its function seems to vary according the stage and the type of tumor. Given the function of QSOX1-S in stress and cancer, two processes which have been previously linked to autophagy, we have studied the role of QSOX1-S in autophagy. We showed that QSOX1 expression is induced following autophagy induction and that the protein can maintain cellular homeostasis. Our results also indicated that QSOX1 inhibits autophagy through the inhibition of autophagosome/lysosome fusion and that QSOX1 might reduce cell invasion through its role in autophagy.

The GABARAPL1 protein belongs to the ATG8 family and GABARAP subfamily whose members have been described to be involved in autophagy. Our laboratory previously demonstrated that GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles during autophagy and other laboratories suggested that the members of the GABARAP subfamily might be necessary for the later stages of autophagy. GABARAPL1 is also involved in glycophagy, the selective degradation of glycogen through autophagy, suggesting a function of this protein in metabolism. Moreover, GABARAPL1 has been shown to inhibit cancer cell phenotypes *in vitro* and tumor growth *in vivo*, suggesting a role of GABARAPL1 as a tumor suppressor. Given the function of GABARAPL1 in cancer and autophagy, we aimed to characterize the role of GABARAPL1 in autophagy and determine whether GABARAPL1 conjugation to autophagosomes is necessary for its tumor suppressive functions. Our results demonstrated that GABARAPL1 presents different regulatory functions during early and later stages of autophagy. Some of these functions seem to be independent of its conjugation to autophagosomes. Interestingly, GABARAPL1 tumor suppressive function appeared independent of its conjugation to the lipids of the autophagosomes. Our results have also demonstrated that GABARAPL1 play an important role in the regulation of metabolism and mitochondrial homeostasis through autophagy, function which could explain its role in cancer.

Together, this work brought substantial new data on the role of GABARAPL1 and QSOX1 in autophagy in breast cancer cell models allowing us to establish a link between autophagy, cellular stress, metabolism and cancer.

Keywords: QSOX1, GABARAPL1, GABARAP, breast cancer, autophagy

L'objectif de ces travaux de thèse était d'étudier l'implication de l'autophagie dans le cancer *via* l'analyse de deux protéines QSOX1 et GABARAPL1.

La protéine QSOX1 possède deux isoformes majoritaires QSOX1-S et QSOX1-L et est impliquée dans le repliement correct des protéines par la création de ponts disulfures. Des études de notre laboratoire ont également mis en évidence que QSOX1-S est impliquée dans la protection contre les stress et le cancer. En effet, l'expression de QSOX1-S est induite suite à un stress oxydant ou un stress du réticulum endoplasmique et protège les cellules contre la mort induite par ces stress. De plus, QSOX1-S réduit les phénotypes des cellules de cancer du sein *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*. Néanmoins, le rôle de QSOX1 dans le cancer est complexe et diffère selon les types de cancer, principalement à cause de l'existence de ces différents transcrits. Etant donné le rôle de QSOX1-S dans les stress et le cancer, deux mécanismes étroitement liés à l'autophagie, nous avons étudié le rôle de QSOX1-S dans l'autophagie. Nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'expression de QSOX1-S augmente suite à l'induction de l'autophagie et permet le maintien de l'homéostasie cellulaire. Nous avons également démontré que QSOX1-S inhibe le flux autophagique en inhibant la fusion autophagosome/lysosome et pourrait réduire l'invasion des cellules de cancer du sein par sa fonction dans l'autophagie.

La protéine GABARAPL1 appartient à la famille ATG8 et sous-famille GABARAP dont les membres sont impliqués dans l'autophagie. Il a été mis en évidence au sein de notre laboratoire que GABARAPL1 est associée aux autophagosomes lors de l'autophagie. Les membres de la famille GABARAP interviendraient lors des étapes tardives de l'autophagie. Un rôle de la protéine GABARAPL1 dans la dégradation du glycogène par autophagie, appelée glycophagie, a également été mis en évidence, suggérant une fonction de cette protéine dans le métabolisme. De plus, GABARAPL1 inhibe les phénotypes des cellules de cancer du sein *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*, suggérant un rôle de suppresseur de tumeur de cette protéine. Au vu du rôle de GABARAPL1 dans le cancer et l'autophagie, nous avons poursuivi et approfondi le rôle de cette protéine dans l'autophagie et étudié l'implication de l'autophagie dans les fonctions de GABARAPL1 liées aux cellules cancéreuses. Nous avons mis en évidence que GABARAPL1 agit au niveau des étapes précoces et tardives de l'autophagie de manière dépendante ou indépendante de sa liaison aux autophagosomes. De façon intéressante, nos résultats montrent que la fonction de suppresseur de tumeur de GABARAPL1 semble indépendante de sa liaison aux autophagosomes. Nos résultats ont également mis en évidence que GABARAPL1 joue un rôle important dans la régulation du métabolisme cellulaire et dans la régulation de l'homéostasie mitochondriale *via* l'autophagie qui pourrait expliquer son rôle dans le cancer.

L'ensemble de ces travaux ont permis de mieux caractériser et d'identifier des liens entre autophagie, stress cellulaire, métabolisme et cancer.

Mots clés : QSOX1, GABARAPL1, GABARAP, cancer du sein, autophagie