



HAL
open science

Etude du rôle de la protéine autophagique ATG9A dans les cancers du sein

Aurore Claude-Taupin

► **To cite this version:**

Aurore Claude-Taupin. Etude du rôle de la protéine autophagique ATG9A dans les cancers du sein. Cancer. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCE007 . tel-01801758

HAL Id: tel-01801758

<https://theses.hal.science/tel-01801758v1>

Submitted on 28 May 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 BOURGOGNE-FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES DE BESANCON

**Doctorat de l'Université de Bourgogne-Franche-Comté
Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole Doctorale Environnements-Santé**

**ETUDE DU ROLE
DE LA PROTEINE AUTOPHAGIQUE ATG9A
DANS LES CANCERS DU SEIN**

THESE

Soutenance prévue le 9 Janvier 2017

Par

Aurore CLAUDE-TAUPIN

Née le 3 Juin 1990 à Epinal (88)

Membres du Jury :

• **Rapporteurs :**

Dr. Maryam MEHRPOUR, Chargée de Recherche (CR1), INSERM U1151, Paris.

Dr. Catherine-Laure TOMASETTO, Directrice de Recherche (DR2), INSERM U964, Strasbourg.

• **Examineurs :**

Dr. Pierre-François CARTRON (CR1), Chargé de Recherche, INSERM U892, Nantes.

Pr. Bruno CHATTON, Professeur des Universités (PR1), INSERM U7242, Strasbourg.

• **Directeur de thèse :**

Pr. Michaël BOYER-GUITTAUT, Professeur des Universités (PR2), EA3922, Besançon.

• **Co-directeur de thèse :**

Dr. Eric HERVOUET, Maître de conférences, EA3922, Besançon.

Remerciements

*Il n'existe pas de sujet peu intéressant,
Il n'y a que des personnes peu intéressées.*

Gilbert Keith Chesterton

*Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir.
Autrement dit : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.*

Devise Shadok

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Maryam Mehrpour et le Dr. Catherine-Laure Tomasetto de m'avoir fait l'honneur de juger ces travaux de thèse.

Je remercie le Pr. Bruno Chatton et le Dr. Pierre-François Cartron d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse ainsi que de faire partie de ce jury de thèse. Vos conseils ont toujours été très avisés et m'ont beaucoup aidé pour avancer ces travaux.

Je remercie mille fois mes directeurs de thèse, Michaël et Eric, pour m'avoir donné ma chance il y a déjà trois ans. Merci à toi Michaël d'avoir toujours été présent pour moi, même si je n'en ai pas profité dès le début de ma thèse. Tu as toujours su trouver les mots pour me remonter le moral dans les moments difficiles et me donner de nouvelles perspectives pour avancer ce projet. Je n'oublierai pas non plus tout le temps que tu as passé pour moi pour mon départ vers les U.S.A., c'est en grande partie grâce à toi si je m'envole vers Albuquerque dans quelques jours pour de nouvelles aventures avec ATG9A ! Merci à toi Eric pour ta présence à mes côtés pour les manip. Cela m'a beaucoup aidé au début de ma thèse pour prendre confiance. Tu as toujours répondu présent pour m'aider à prendre les bonnes décisions à la paillasse. Merci à vous deux de m'avoir épaulée durant ces trois années, mais surtout dans les derniers instants !

Si je suis arrivée jusqu'ici, c'est grâce à des personnes formidables et passionnées qui étaient mes professeurs sur les bancs de la fac et que j'ai pu découvrir sous un autre jour au laboratoire. Régis, merci pour ta disponibilité. Tu as toujours été là lorsque l'on a eu besoin de toi, que cela soit pour relire ce manuscrit ou pour porter des bouteilles de CO₂ ! Gilles, merci à toi pour tes petites irruptions dans notre bureau, pour tous tes conseils sur mes résultats et la soutenance. Annick, merci d'avoir toujours été présente pour nous reconforter dans les moments durs et pour tes conseils de maman toujours très avisés. Karine, nous n'avons pas travaillé ensemble mais j'ai toujours adoré parler avec toi pendant les pauses de midi ! Paul, j'ai adoré travailler à tes côtés. Tu as toujours le mot pour rire et j'espère que tu garderas pour toi la petite anecdote de la salle de culture survenue il y a quelques semaines... Jean, merci pour ta bonne humeur à toute épreuve. Pascale, je ne te remercierai jamais assez de tout ce que tu as fait pour moi. Tu as toujours été là dans les instants les plus difficiles et tu as toujours su trouver les mots pour me reconforter et me redonner l'envie de continuer. Je n'oublierai jamais ces mots que tu as prononcés le jour où je suis venue au laboratoire, juste avant de déposer mon dossier à l'école doctorale : « Tout sujet devient intéressant à partir du moment où l'on s'y intéresse ». C'est devenu l'une de mes devises. Encore merci !

Je remercie mes compagnons de paillasse :

Valérie, merci pour ta présence et ta ténacité à tenter de nous procurer du matériel stérile avec un autoclave récalcitrant. Je sais que nous avons eu quelques maux pendant ma

thèse, mais sache que je n'ai jamais rien fait dans le but de te nuire. J'espère que tu garderas un bon souvenir de moi. Dominique, tu es arrivé au labo il y a peu mais je te connais depuis quelques années maintenant. Cela a toujours été un grand plaisir de travailler à tes côtés. Tu respire la joie de vivre. Tout ce que j'aime ! Je te souhaite tout le meilleur dans tes nouvelles fonctions !

Un grand merci aux thésardes du labo qui vont tellement me manquer:

Leïla, j'ai toujours adoré travailler avec toi car tous les jours, il y a une nouvelle anecdote au compteur. Sacré Leïla, tu nous les auras toutes faites ! Je te souhaite tout plein de manips qui marchent. Garde la pêche, tu n'est pas arrivée ici par hasard, alors donnes le meilleur de toi-même pour ne rien regretter. Je te souhaite surtout plein de bonheur dans ta vie personnelle, car c'est quand même ça le plus important et qui nous fait tenir les jours de manips qui foirent ! Marine, le nouveau bébé du labo ! Il n'y a pas si longtemps que ça, j'étais à ta place et ça passe tellement vite ! Je suis certaine que tu va nous faire une thèse de ouf car t'es une sacré bosseuse ! C'était un plaisir d'arriver au labo le matin et pouvoir dire : « salut mon p'tit » en salle de culture. Reste comme tu es. T'es au top.

Merci aux autres étudiants en thèse : Thierry et Omy pour m'avoir toujours inscrite au cytomètre et au confocal et pour m'avoir aidée pour les manips *in vivo* et les tris en cytométrie. Vous avez vraiment été au top. Jérôme pour ta joie de vivre et notre passion commune pour Dikkenek, courage pour la fin de ta thèse !

Un énorme merci à mes deux post-doc préférées : Sandrine, merci à toi de m'avoir aussi bien accueillie à mon arrivée au labo. On est depuis devenues amies. Tant de rires et de bons souvenirs ensemble. Laura, que dire ? Je pourrais écrire une thèse sur nous. Tu as tellement contribué à la réalisation de cette thèse mais tu m'as tellement manqué aussi cette dernière année qui a été riche en émotions pour moi. T'es une amie en or. Je ne te remercierai jamais assez de tout ce que tu as fait pour moi. Rien ne pourrait briser cette belle amitié qui nous unis. Perez-Taup'institute 4 ever <3

Je termine par les personnes extérieures au laboratoire qui ont largement contribué au bon déroulement de cette thèse : Clémence, pour ta présence depuis le début du M2. On s'est serré les coudes jusqu'au bout : tous des Toc.. ! Je t'abandonne un mois avant la date fatidique pour toi mais sache que tu pourras toujours compter sur moi ! Charline, alias Sal..., t'es à mes cotés depuis le lycée et notre amitié a été plus forte que tout. On a gravit les étapes ensemble et tu es encore à mes cotés aujourd'hui. Merci !

Je remercie également ma famille et ma belle-famille qui me soutiennent même s'ils ne comprennent pas toujours tout ... !

Je remercie surtout mon mari Christophe. Tu m'a toujours soutenue et donné la force de gravir les échelons. Tu n'as pas hésité à tout quitter pour me suivre jusqu'à l'autre bout du monde. Sans toi, je ne serais certainement pas ici aujourd'hui. Cette thèse, c'est la tienne autant que la mienne. Je t'aime !

Je souhaiterais également dédier cette thèse à la plus belle des expériences que j'aie pu réaliser dans ma vie : ma princesse Eloïse. Je suis tellement fière d'être ta maman et j'espère que tu seras un jour fière de moi quand tu liras ce manuscrit. J'espère que tu réaliseras tes rêves les plus fous dans ta vie de femme, comme je peux aujourd'hui le faire avec ton papa !

Je termine par une grosse pensée vers mon Papa, qui je l'espère, est fier de moi depuis les étoiles.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	3
TABLE DES FIGURES.....	5
ABREVIATIONS ET ACRONYMES	7
CADRE ET BUT DU TRAVAIL.....	11
INTRODUCTION	15
1. Les cancers du sein	17
1.1 Généralités.....	17
1.2 Les différents types de cancer du sein	18
1.2.1 Les cancers du sein de type luminal.....	19
1.2.2 Les cancers du sein de type HER2.....	20
1.2.3 Les cancers du sein de type triple négatif.....	20
1.3 Recherche de nouvelles cibles pour traiter les cancers du sein.....	21
1.3.1 Résistances aux thérapies hormonales.....	21
1.3.2 Identification de nouvelles cibles pour les patientes triple négatives.....	23
2. Autophagie et cancer du sein	25
2.1 Autophagie.....	25
2.1.1 Définition générale.....	25
2.1.2 Différents types d'autophagie	26
2.2 Mécanismes cellulaire et moléculaire de la macroautophagie.....	27
2.2.1 Mécanisme cellulaire.....	27
2.2.2 Induction de l'autophagie.....	29
2.2.3 Elongation et fermeture des autophagosomes	37
2.3 La protéine autophagique ATG9A.....	46
2.4 La protéine Atg9 chez la levure	48
2.5 La protéine ATG9A chez les mammifères	49
2.6 Régulation de la localisation d'ATG9A	51
3. Autophagie et cancers	54
3.1 Autophagie et rôle suppresseur de tumeur	55
3.1.1 Le rôle suppresseur de tumeur des protéines ATG	55
3.1.2 Mécanismes anti-tumoraux de l'autophagie.....	56
3.2 Le rôle pro-tumoral de l'autophagie.....	58
3.2.1 L'hypoxie	58
3.2.2 Détachement de la matrice extracellulaire.....	59

3.2.3	Transformation oncogénique	59
3.2.4	Mort cellulaire de type II	60
3.2.5	Cellules souches cancéreuses	60
3.3	Cibler l'autophagie dans les cancers du sein	61
3.3.1	Inhiber l'autophagie pour augmenter l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses	61
3.3.2	Induction de la mort autophagique	62
3.3.3	Cibler la régulation épigénétique des gènes de l'autophagie	63
RESULTATS	69
1.	Contexte de l'étude	71
2.	Régulation épigénétique de l'expression du gène <i>GABARAPL1</i> dans les cancers du sein.....	71
3.	Etude du rôle de la protéine autophagique <i>ATG9A</i> dans les cancers du sein	91
3.1	Rôle d' <i>ATG9A</i> dans la lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-436.....	92
3.2	Rôle d' <i>ATG9A</i> dans la lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231	130
DISCUSSION	140
1.	Autophagie, épigénétique et cancer.....	142
2.	Gènes de l'autophagie et cancer du sein.....	145
3.	<i>ATG9A</i> et cancer du sein triple négatif	149
3.1	<i>ATG9A</i> et lignée MDA-MB-436	149
3.2	<i>ATG9A</i> et lignée MDA-MB-231	155
ANNEXES	160
1.	Communications affichées	162
2.	Communications orales	166
3.	Publication III.....	168
4.	Revue.....	183
BIBLIOGRAPHIE	209

Figure 1 : Anatomie du sein.....	17
Figure 2 : Exemple des mécanismes de résistances aux thérapies hormonales décrites dans les cellules cancéreuses	22
Figure 3 : Représentation des trois types d'autophagie	26
Figure 4 : Différentes étapes de l'autophagie	28
Figure 5 : Régulation du complexe ULK par mTORC1 et AMPK	30
Figure 6 : Induction de l'autophagie par une carence en nutriments.....	33
Figure 7 : Induction de l'autophagie par le stress oxydant.....	35
Figure 8 : Régulation de l'étape de nucléation par les protéines WIPI	36
Figure 9 : Système de conjugaison du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1	38
Figure 10 : Alignement des séquences protéiques de la famille ATG8.....	39
Figure 11 : Structure cristallographique des membres de la famille ATG8 ainsi que de l'ubiquitine.....	40
Figure 12 : Système de conjugaison des protéines de la famille ATG8	41
Figure 13 : Mécanismes moléculaires de de la fusion autophagosome/lysosome.....	45
Figure 14 : ATG9A et ATG9B chez l'homme	47
Figure 15 : Régulation de la localisation intracellulaire d'ATG9A.....	51
Figure 16 : Rôles pro- et anti-tumoraux de l'autophagie.....	55
Figure 17 : Inhibiteurs de l'autophagie.....	62
Figure 18 : Séquences des sh-ARN et ARN guide utilisées pour nos modèles d'extinction de l'extinction de l'expression d'ATG9A par sh-ARN et la technique CRISPR-Cas9, respectivement	93
Figure 19 : Expression de l'ARNm d'ATG9A dans les lignées de cancer du sein triple négatif	129
Figure 20 : Expression d'ATG9A dans les lignées de cancer du sein triple négatives	130
Figure 21 : Modèle d'extinction de l'expression d'ATG9A par sh-ARN dans la lignée MDA-MB-231	131
Figure 22 : L'extinction d'ATG9A par sh-ARN dans les cellules MDA-MB-231 ne modifie pas les phénotypes cancéreux <i>in vitro</i>	131
Figure 23 : L'extinction d'ATG9A par sh-ARN dans la lignée MDA-MB-231 conduit à une baisse de l'accumulation de LC3B-II, indépendante de l'activité de mTOR	132
Figure 24 : L'extinction d'ATG9A par sh-ARN conduit à une baisse significative de l'acidification des vésicules	133
Figure 25 : Quantification des autophagosomes et autophagolysosomes dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436	134
Figure 26 : Quantification du taux de LC3B-II par Western-Blotting dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436.....	135
Figure 27 : Le traitement par 3-MA pendant 3 jours inhibe la prolifération des cellules MDA-MB-436, mais pas celle des cellules MDA-MB-231	137
Figure 28 : Schéma récapitulatif des modifications de phénotypes induites par la perte de l'expression d'ATG9A dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436	138
Figure 29 : Mécanismes pouvant être impliqués dans le maintien des phénotypes cancéreux des cellules CRISPR- <i>ATG9A</i>	150

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

3-MA	: 3-méthyladénine		
ADN	: Acide désoxyribonucléique		
ALFY	: Autophagy-linked FYVE protein		
AMBRA1	: Activating molecule in Beclin 1 related autophagy 1		
AMP	: Adénosine monophosphate		
AMPK	: AMP-activated protein kinase, protéine kinase activée par l'AMP		
ATG	: Autophagy-related		
ATP	: Adénosine triphosphate		
BRCA1	: Breast Cancer 1		
BAF	: Bafilomycin A1		
CDK	: Cyclin Dependant Kinase		
ChIP	: Chromatin immunoprecipitation, immunoprécipitation de chromatine		
CLEAR	: Coordinated lysosomal expression and regulation		
CMA	: Chaperone-mediated autophagy, autophagie dépendante des chaperonnes		
CSC	: Cellule souche cancéreuse		
DEPTOR	: DEP domain containing mTOR-interacting protein, protéine interagissant avec mTOR, contenant un domaine DEP.		
DFCP1	: Double FYVE-containing protein 1		
DNMT1	: DNA methyl transférase 1		
EGFR	: Epidermal Growth factor Receptor, récepteur au facteur de croissance épidermique		
ER	: Réticulum endoplasmique		
FDA	: Food and Drug Administration		
FGF	: Fibroblast growth factor, facteur de croissance fibroblastique		
FYCO1	: FYVE and coiled-coil domain-containing protein		
FOXO3a	: Factor forkhead box O3a		
GABARAP	: GABA _A receptor-associated protein		
GABARAPL1	: GABARAP – like 1		
GABARAPL2	: GABARAP – like 2		
GABARAPL3	: GABARAP – like 3		
GATE-16	: Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa		
GEC1	: Glandular endothelial cell 1		
GOS-28	: Golgi SNARE protein 28		
HAT	: Histone acétyl transférase		
HDAC	: Histone désacétylase		
HER2	: Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain		
HIF1	: Hypoxia inducible factor 1		
hMOF	: Human males absent on the first		
HOPS	: Homotypic fusion and vacuole protein sorting complex		
HSC70	: Constitutively expressed form of heat shock protein of 70 kDa, forme constitutivement exprimée		
			de la protéine de choc thermique de 70 kDa
IGF	: Insulin growth factor, Facteur de croissance à l'insuline		
JNK1	: c-Jun N-terminal kinase 1		
LAMP1	: Lysosome-associated membrane protein 1, protéine lysosomale associée à la membrane 1		
LAMP2A	: Lysosome-associated membrane protein 2A, protéine membranaire associée au lysosome 2A		
LAP	: LC3-associated phagocytosis		
LC3	: Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3		
LIR	: LC3-interacting region, région interagissant avec LC3		
LKB1	: Liver kinase B1		
LMP	: Lysosomal membrane protein, protéine de la membrane lysosomale		
MAPK	: Mitogen-activated protein kinases		
MAP-LC3	: Microtubule-associated protein light chain 3		
mLST8	: Mammalian lethal with sec-13 protein 8, protéine 8 mammaire létale avec sec-13		
MRLC	: Myosin regulatory light chain		
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin		
mTORC1	: Complexe 1 de mTOR		
NBR1	: Neighbor of BRCA1 gene 1		
NDP52	: Nuclear dot protein of 52 kDa		
OIS	: Oncogene-induced senescence		
P38α MAPK	: P38 α mitogen-activated protein kinase		
P38IP	: P38 interacting protein		
PARP	: Poly(ADP-ribose) polymérase		
PAS	: Phagophore Assembly Site		
PE	: Phosphatidyléthanolamine		
PD-1	: Program death-1		
PDB	: Protein Data Bank		
PD-L1	: Program death-ligand 1		
PI3K	: Phosphatidyl inositol 3-OH kinase		
PI3KC3	: Complexe PI3K de classe III		
PI3P	: Phosphatidyl-inositol-3-phosphate		
PI4K2A	: Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 α		
PKA	: Protéine kinase A		
PLEKHM1	: Pleckstrin homology domain containing protein family member 1		
PRAS40	: Proline-rich Akt substrate 40kDa, substrat d'Akt de 40 kDa, riche en proline		
PX-RCIS	: Phox homology-RhoGAP involved in the β -catenin-N-cadherin and NMDA receptor signaling		
RA	: Récepteur aux androgènes		

Abréviations et Acronymes

RAPTOR	: Regulatory-associated protein of mTOR, protéine de régulation associée à mTOR	TFEB	: Transcription factor EB, facteur de transcription EB
RASSF1A	: Ras association domain family 1 isoform A	TILs	: Tumor infiltrating Lymphocytes, lymphocytes infiltrant la tumeur
RE	: Récepteur aux estrogènes	TMA	: Tissue Microarray
Rheb	: Ras homolog enriched in brain	TN	: Triple négatif
RISC	: RNA-induced silencing complex	TSC2	: Tuberous sclerosis complex 2
ROS	: Reactive oxygen species, espèces réactives à l'oxygène	TSA	: Trichostatine A
RP	: Récepteur à la progestérone	UBL	: Ubiquitin-like
Rubicon	: Run domain beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein	ULK1	: Unc-51 like autophagy activating kinase 1
SIRT1	: Sirtuine 1	VEGF	: Vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
SNARE	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor	VPS34	: Vacuolar protein sorting 34
SQSTM1	: Séquestosome 1	WIPI	: WD-repeat domain phosphoinositide-interacting
STX17	: Syntaxine 17	WT	: Wild-type
		ZIPK	: Zipper- interacting protein kinase

CADRE ET BUT DU TRAVAIL

Cette thèse, débutée en octobre 2013, s'inscrit dans les travaux de l'EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central » et concerne l'étude de l'implication de l'autophagie dans les cancers du sein avec pour modèle l'analyse de la protéine ATG9A.

Notre équipe de recherche a identifié le gène *GEC1/GABARAPL1* (*Glandular epithelial cell 1/GABA_A receptor-associated protein like 1*) comme étant régulé positivement par les estrogènes dans un modèle de cellules d'endomètre de cobaye (Pellerin *et al*, 1993; Vernier-Magnin *et al*, 2001). La protéine GABARAPL1 a d'abord été décrite pour être impliquée dans le transport intracellulaire de récepteurs dans le cerveau *via* son interaction avec la tubuline et le récepteur GABA_A (Mansuy *et al*, 2004). Depuis, il a été mis en évidence au laboratoire que GABARAPL1 joue également un rôle dans l'autophagie car elle est associée à la membrane des autophagosomes (Chakrama *et al*, 2010). En effet, cette protéine appartient à la famille ATG8 (*AuTophagy related 8*) qui comprend deux sous-familles : MAP-LC3 (*Microtubule-associated protein light chain 3*) et GABARAP (*GABA_A receptor-associated protein*). GABARAPL1 appartient à la sous-famille GABARAP comprenant GABARAP, GABARAPL1 et GATE16/GABARAPL2 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa/GABA_A receptor-associated protein like 2*). La protéine GABARAPL1 possède également un rôle suppresseur de tumeur. En effet, notre laboratoire a mis en évidence une perte de l'expression de *GABARAPL1* dans des tissus cancéreux comparativement à des tissus normaux (Nemos *et al*, 2003). D'autre part, GABARAPL1 inhibe la prolifération de cellules de cancer du sein *in vitro* et une forte expression du gène *GABARAPL1* est également associée à un facteur de bon pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein (Berthier *et al*, 2010). De plus, l'inhibition de l'expression de GABARAPL1 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-436 conduit à l'aggravation des phénotypes cancéreux de cette lignée et à une diminution du flux autophagique (Boyer-Guittaut *et al*, 2014).

Ces données suggèrent donc que le rôle de GABARAPL1 dans les cancers est en lien avec sa fonction dans l'autophagie. C'est pourquoi ce projet de thèse a eu pour but initial de :

- déterminer comment l'expression de *GABARAPL1* est régulée dans les cancers du sein, en analysant les modifications épigénétiques au niveau de ce gène,
- quantifier l'expression de différents gènes de l'autophagie dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein afin de déterminer si d'autres gènes de l'autophagie pourraient être régulés comme *GABARAPL1* dans ce type de cancer.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que l'expression d'*ATG9A* est augmentée dans les tissus cancéreux comparativement au tissu sain adjacent dans notre cohorte de patientes atteintes de cancer du sein. L'objectif secondaire de cette thèse a donc consisté en l'étude du rôle de la protéine autophagique *ATG9A* dans la lignée cellulaire MDA-MB-436 de cancer du sein triple négatif.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de trois publications, dont une en préparation. Par ailleurs, une revue décrivant le rôle des agents modulant les modifications épigénétiques dans les cancers du sein a été également publiée.

Claude-Taupin A, Fonderflick L, Gauthier T, Mansi L, Monnier F, Algros MP, Delage-Mourroux R, Hervouet E, Boyer-Guittaut M. *ATG9A is overexpressed in triple negative breast cancer and its in vitro/in vivo extinction leads to the inhibition of pro-cancer phenotypes. En préparation.*

Claude-Taupin A, Boyer-Guittaut M, Delage-Mourroux R, Hervouet E. *Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for breast cancer therapies. Methods Mol Biol, 2015. Review*

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.*

Hervouet E, **Claude-Taupin A**, Gauthier T, Perez V, Fraichard A, Adami P, Despouy G, Monnier F, Algros MP, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. *The autophagy GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. BMC Cancer, 2015.*

INTRODUCTION

1. Les cancers du sein

1.1 Généralités

Le sein a pour fonction biologique de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né. Chaque sein contient ainsi une glande mammaire et du tissu de soutien qui contient des vaisseaux, des fibres et de la graisse. Les glandes mammaires sont constituées d'une vingtaine de compartiments séparés par du tissu graisseux. Chacun de ces compartiments est constitué de lobules producteurs de lait en période d'allaitement et de canaux transportant le lait produit vers le mamelon. L'épithélium mammaire est constitué d'une enveloppe formée par des cellules myoépithéliales (cellules basales) ainsi que de cellules épithéliales (cellules luminales). Les cellules luminales ont un rôle de production du lait et sont caractérisées notamment par l'expression de récepteurs hormonaux, tel que celui liant les estrogènes (récepteur aux estrogènes, RE) ou encore le récepteur à la progestérone (RP). Les cellules basales, quant à elles, se contractent pour permettre l'éjection du lait (**Figure 1**).

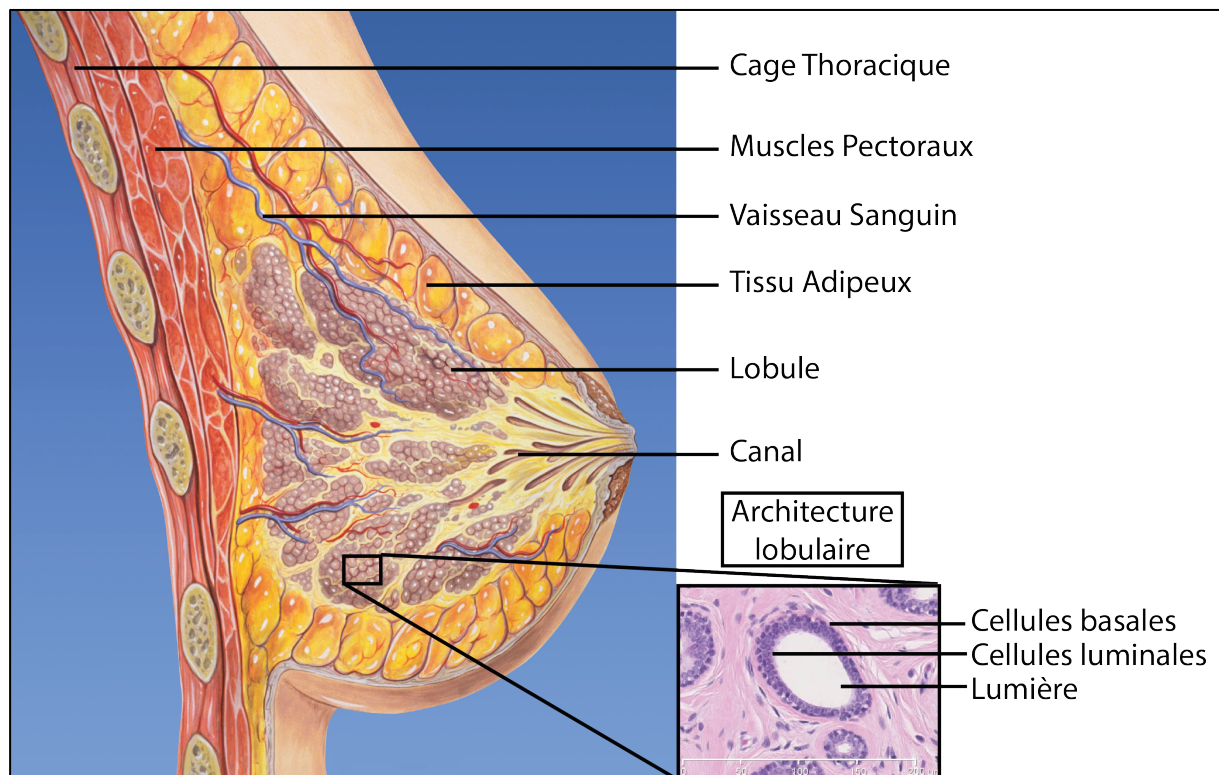


Figure 1 : Anatomie du sein. Adapté de l'illustration de Lynch, 2006.

Le cancer du sein est l'un des trois cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez les femmes (25,2 %, suivi du cancer colorectal : 9,2 % et du cancer du foie : 8,7 %) et on estime que 53 969 nouveaux cas de cancers du sein féminin vont être diagnostiqués en France en 2020 (Ferlay *et al*, 2015). Grâce à une meilleure détection et des traitements plus adéquats, la mortalité liée à ce cancer a diminué de 11 % au cours des 20 dernières années en France (Autier *et al*, 2010). Cependant, plus de 13 000 décès liés à ce cancer sont encore estimés pour 2020 en France.

Le cancer du sein se développe le plus fréquemment (95 % des cas) au niveau des cellules épithéliales. On l'appelle dans ce cas adénocarcinome, et il naît le plus souvent à partir de cellules de canaux (carcinome canalaire) et plus rarement à partir de cellules de lobules (carcinome lobulaire, 10 à 15 % des adénocarcinomes). Le cancer du sein est un processus multi-étapes où les cellules cancéreuses se trouvent à l'origine uniquement à l'intérieur des canaux ou des lobules, sans franchir la membrane basale (carcinome *in situ*), pour ensuite infiltrer les tissus avoisinants (carcinome infiltrant). Les carcinomes infiltrants sont associés à un risque d'envahissement ganglionnaire (les ganglions lymphatiques de l'aisselle sont les premiers à être potentiellement touchés) et de métastases.

1.2 Les différents types de cancer du sein

En pratique clinique, le cancer du sein est considéré comme une maladie hétérogène qui est catégorisée en 3 groupes thérapeutiques. Cette distinction est réalisée grâce à une approche de marquages immunohistochimiques, détectant la présence de différents marqueurs cellulaires : le récepteur aux œstrogènes (RE), le récepteur à la progestérone (RP) ainsi que le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). L'analyse de l'expression de ces 3 marqueurs a ainsi permis de décrire 3 groupes de patientes : luminal, HER2 et triple négatif, qui sont associés à des diagnostics et des protocoles thérapeutiques distincts (**Tableau D**). Cette classification immunohistochimique est actuellement utilisée en pratique clinique mais depuis quelques années, le développement de l'analyse de l'expression génique des cancers du sein a permis de classifier de manière plus fine ces sous-types de cancers du sein mais également de mettre en évidence de nouveaux sous-groupes (Cancer Genome Atlas Network, 2012). En effet, les cancers du sein triple négatifs ont pu être subdivisés en 6 sous-groupes par l'analyse de l'expression génique de près de 600 patientes triple négatives (Lehmann *et al*, 2011). Cette nouvelle classification pourrait très prochainement être utilisée pour compléter la classification actuelle, mais cette classification encore imparfaite doit

encore prouver sa reproductibilité et sa robustesse pour être recommandée en pratique clinique.

Tableau I: Caractéristiques des différents sous-types de cancer du sein. RE, Récepteur aux estrogènes; RP, Récepteur à la progestérone; HER2, récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain.

Sous-type	Origine	RE	RP	HER2	Pronostic	Protocole Thérapeutique
Luminal A	Cellule luminaire	+	+/-	-	Favorable	Hormonothérapie
Luminal B	Cellule luminaire	+	+/-	+	Intermédiaire	Hormonothérapie +anti-HER2 +Chimiothérapie
HER2	Cellule luminaire	-	-	+	Intermédiaire	anti-HER2 +Chimiothérapie
Triple négatif	Cellule basale	-	-	-	Défavorable	Chimiothérapie

1.2.1 Les cancers du sein de type luminal

Le terme luminal a été donné à un type de cancer du sein, par rapport au nom d'un des deux types cellulaires composant l'épithélium mammaire: les cellules lumineuses. En effet, les cancers du sein de type luminal (A et B) sont caractérisés par l'expression du RE (RE⁺), qui est impliqué dans la prolifération, la survie et l'invasion des cellules cancéreuses de sein. Ce type de cancer représente environ 70 % des cancers du sein (Wenger *et al*, 1993) et est généralement associé à un bon pronostic. En effet, l'utilisation de traitements hormonaux, ciblant la voie de signalisation du RE, a montré son efficacité sur ce type de patientes puisqu'il permet de réduire à la fois la mortalité et le risque de rechute, avec ou sans chimiothérapie associée. Par exemple, l'utilisation de tamoxifène, un anti-estrogène qui agit comme un antagoniste de l'estradiol, permet de réduire de moitié le risque de rechute, et d'un tiers la mortalité (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) *et al*, 2011). Les inhibiteurs de l'aromatase (une enzyme permettant la synthèse d'estrogènes à partir d'androgènes), sont également prescrits dans le traitement des cancers du sein RE⁺ chez les femmes ménopausées. En effet, le létrozole, un inhibiteur compétitif de l'aromatase, améliore significativement le taux de réponses objectives chez ces patientes, comparé à un traitement par le tamoxifène (32 % contre 21 %, respectivement) (Mouridsen *et al*, 2003).

Environ 10 % des cancers du sein de type luminal expriment à la fois le RE et HER2 (Dowsett *et al*, 2008). Ces patientes RE⁺ et HER2⁺ (luminal B) présentent généralement un pronostic moins bon que les patientes RE⁺ (luminal A). Ceci est dû à l'amplification du gène *HER2*, qui est associé à un phénotype de prolifération élevé. Comme les patientes luminal B

expriment à la fois le RE et HER2, elles peuvent bénéficier de thérapies combinant à la fois un traitement hormonal et un traitement ciblant HER2, tel que le trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre HER2.

1.2.2 Les cancers du sein de type HER2

Les patientes HER2⁺ sont caractérisées par l'amplification de l'oncogène *HER2* et représentent environ 10 % des cancers du sein. Il semblerait que les cellules luminales mammaires soient à l'origine de ces tumeurs. La protéine HER2 est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase et son activation et dimérisation permet l'activation de différentes voies de signalisation contribuant à la carcinogénèse et à la progression du cancer (Iqbal & Iqbal, 2014). Les tumeurs HER2⁺ diffèrent des patientes de type luminal B par l'absence de l'expression du RE. Les thérapies hormonales ne sont donc d'aucune efficacité. La surexpression d'HER2 était initialement associée à un mauvais pronostic mais depuis les quinze dernières années, le développement de nouvelles thérapies dirigées contre HER2, comme le trastuzumab et le pertuzumab, qui sont des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre HER2, ou encore le lapatinib qui est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase d'HER2, ont permis d'améliorer de manière significative le devenir de ce type de patiente. La combinaison de ces thérapies ciblées avec des chimiothérapies a montré une bonne efficacité sur la survie à long terme de ces patientes. Par exemple, la combinaison de trastuzumab avec des taxanes (tel que le paclitaxel, qui a pour rôle de stabiliser et rassembler les microtubules cellulaires pour perturber notamment la division cellulaire), permet d'augmenter la survie de 37 % et de diminuer le risque de rechutes de 40 % chez ces patientes (Perez *et al*, 2014).

1.2.3 Les cancers du sein de type triple négatif

Les cancers du sein triple négatif représentent environ 20 % des cancers du sein et sont associés à un mauvais pronostic car ces patientes ont généralement un haut risque de rechute et une moins bonne survie. Les cellules basales mammaires seraient à l'origine de ces tumeurs. Les cancers du sein triple négatifs sont caractérisés par l'absence d'expression des RE, RP et HER2, ce qui rend ces patientes inéligibles à des traitements hormonaux ou ciblant HER2. A ce jour, seule l'utilisation de chimiothérapies conventionnelles telles que des taxanes et/ou des anthracyclines (intercalant de l'ADN) est recommandée pour ce type de patientes. Malgré le faible pronostic des patientes triple négatives, il a été montré que ce groupe de cancer du sein présentait une mortalité et un risque de rechute à 10 ans plus faible lors de l'utilisation de chimiothérapies conventionnelles comparé aux autres sous-types de

cancer du sein (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) *et al*, 2008). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les cancers du sein triple négatifs sont très agressifs et que l'utilisation de chimiothérapies serait plus efficace sur ces tumeurs. Plusieurs études ont également tenté d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'efficacité des chimiothérapies sur les cancers du sein triple négatifs. Pour exemple, les cancers du sein triple négatifs montreraient une expression plus fréquente de la cavéoline-1 (Pinilla *et al*, 2006), impliquée dans les mécanismes permettant la capture cellulaire de nanoparticules d'albumine liées au paclitaxel (Gradishar *et al*, 2005).

1.3 Recherche de nouvelles cibles pour traiter les cancers du sein

Comme décrit précédemment, malgré l'existence de thérapies ciblées pour traiter la plupart des cancers du sein, de nombreuses études ont montré l'existence de résistances *de novo* contre les traitements ou l'apparition de résistances acquises lors de leur utilisation. De plus, comme décrit précédemment, il n'existe à ce jour aucune thérapie ciblée pour les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif. De nombreuses études ont donc été conduites afin de caractériser les phénomènes de tumorigenèse des différents sous-types de cancers du sein au cours des vingt dernières années, dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour combattre ces pathologies.

1.3.1 Résistances aux thérapies hormonales

L'expression du RE est un marqueur moléculaire généralement utilisé pour prescrire une thérapie hormonale. Cependant, une réponse positive à ce type de traitement chez les patientes RE⁺ est d'environ 50 à 70 %. Il existe donc environ 30 % de patientes RE⁺ qui présentent une résistance *de novo* ou acquise aux thérapies hormonales (Gonzalez-Angulo *et al*, 2007). Les résistances *de novo* désignent les tumeurs qui n'ont jamais répondu à l'hormonothérapie, alors que les tumeurs progressant après un premier traitement présentent une résistance acquise. De nombreuses études ont montré que la résistance aux hormonothérapies pouvait être expliquée par différents mécanismes, comme par exemple une faible expression du RE (Harbeck & Rody, 2012), une mutation du RE (Merenbakh-Lamin *et al*, 2013) ou encore l'utilisation de voies de signalisation de prolifération indépendantes des estrogènes (Li *et al*, 2013; Heckler *et al*, 2014) (**Figure 2**).

Ainsi, des études ont mis en exergue l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase chez les patientes RE⁺ résistantes, comme la surexpression de récepteurs de la famille HER, de facteurs de croissance à l'insuline (Insulin Growth Factor, IGF) ou encore de facteurs de

croissance fibroblastiques (Fibroblast Growth Factor, FGF). L'activation de ces voies de signalisation est principalement associée à une hyperactivation de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR (*phosphatidyl inositol 3- kinase – AKT - mammalian Target Of Rapamycin*) (Miller *et al*, 2011) (**Figure 2A**). Des essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité d'inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR et la FDA (*Food and Drug Administration*) a déjà autorisé en 2012 l'utilisation d'éverolimus, un inhibiteur de mTOR, en combinaison avec l'exémestane (un inhibiteur de l'aromatase) chez les femmes ménopausées en récidive.

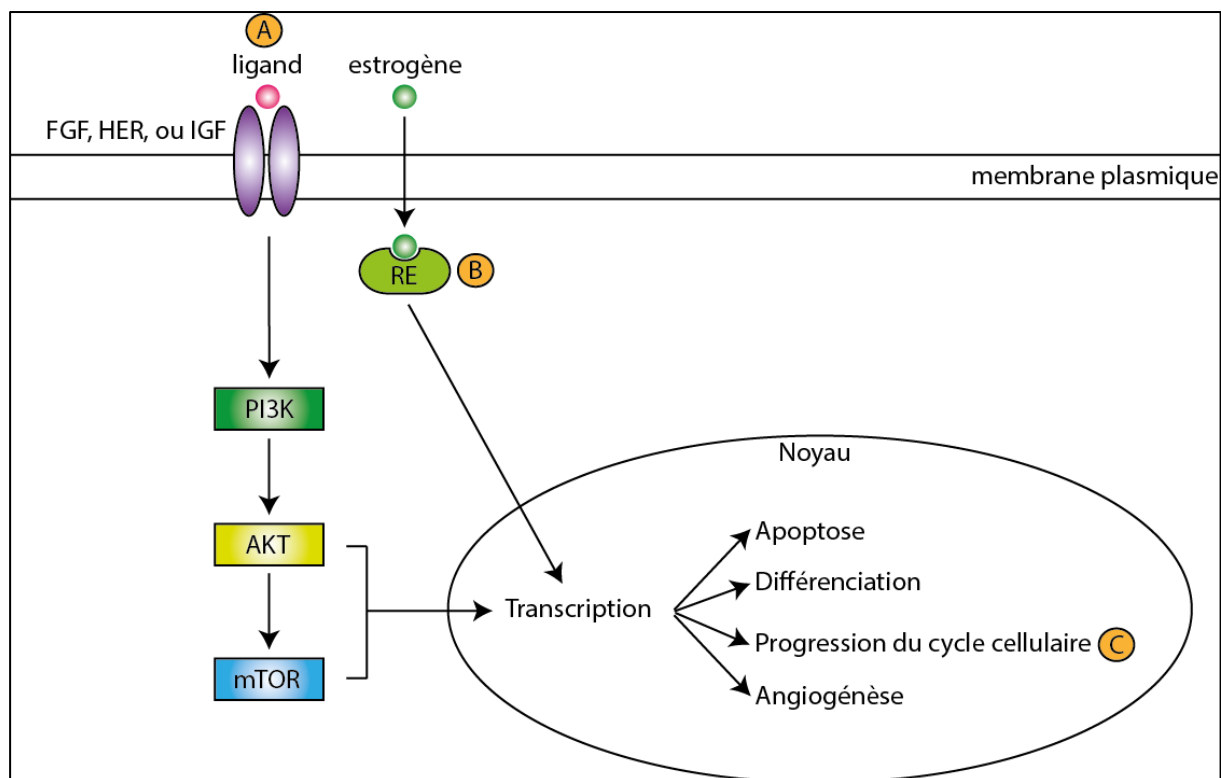


Figure 2 : Exemple de mécanismes de résistances aux thérapies hormonales décrites dans les cellules cancéreuses. (A) Les cellules cancéreuses surexpriment des récepteurs de facteurs de croissance tels que le FGF, HER ou l'IGF permettant l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR et permettant la transcription de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, la différenciation, la progression du cycle cellulaire ou encore l'angiogénèse. (B) Une faible expression du RE ou encore une mutation activatrice constitutive du RE permettrait aux cellules cancéreuses de résister aux thérapies hormonales. (C) L'augmentation de l'expression de la cycline D1, qui contrôle le cycle cellulaire en permettant le passage de la phase G1 vers la phase S, permettrait aux cellules cancéreuses de continuer à proliférer malgré la présence de thérapies hormonales.

Des études pré-cliniques ont également mis en évidence une dérégulation de l'expression de la cycline D1 dans les cancers du sein RE⁺ résistants à l'hormonothérapie (Hui *et al*, 2002; Stendahl *et al*, 2004) (**Figure 2C**). Son implication dans l'oncogénèse repose principalement sur sa capacité à activer les protéines kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6), qui permettent la progression du cycle cellulaire. En effet, il a été montré

une augmentation de l'expression de la cycline D1 dans les cancers du sein de type luminal (Cancer Genome Atlas Network, 2012). La FDA a d'ailleurs autorisé très récemment l'utilisation de palbociclib, un inhibiteur de CDK4/6, en combinaison avec du fulvestrant (un antagoniste compétitif du RE), pour le traitement de patientes luminal A, suite aux résultats d'une étude clinique montrant chez ces patientes une augmentation de la survie sans progression lors de l'utilisation de cet inhibiteur (Walker *et al*, 2016).

Des mutations activatrices du RE ont également été identifiées dans les cancers du sein métastatiques RE⁺ résistants à l'hormonothérapie (Robinson *et al*, 2013; Merenbakh-Lamin *et al*, 2013) (**Figure 2B**). De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement ces formes mutées sont actuellement en étude. Pour exemple, un essai clinique est en cours pour tester l'efficacité du composé ARN-810 (un antagoniste du RE, induisant sa dégradation) dans les cancers du sein RE⁺ résistants ou non au tamoxifène (Lai *et al*, 2015).

1.3.2 Identification de nouvelles cibles pour les patientes triple négatives

Les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif ne disposent à ce jour d'aucune thérapie ciblée. De nombreuses équipes travaillent donc au développement de nouvelles approches pour traiter ces patientes.

Il a notamment été montré que pour environ 10 % des patientes TN, une mutation des gènes *Breast cancer 1 et 2 (BRCA1 et BRCA2)* était détectée (Hartman *et al*, 2012). BRCA1 et 2 ont toutes deux un rôle essentiel dans les mécanismes de réparation par recombinaison homologue (RH) des cassures double-brin de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les cellules cancéreuses mutantes pour les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, qui ne sont plus capables de réparation par RH, présentent une forte instabilité génomique. Les cellules normales disposent de 6 mécanismes de réparation de l'ADN et les PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) sont des enzymes qui jouent un rôle important dans un autre de ces systèmes de réparation de l'ADN : la réparation par excision de base, qui permet d'éliminer les bases azotées endommagées. L'utilisation d'inhibiteurs de PARP afin d'amplifier cette instabilité et d'induire la mort des cellules cancéreuses a donc été très largement étudiée. Des essais cliniques de phase II sont d'ailleurs en cours pour tester l'effet de l'olaparib, un inhibiteur de PARP, chez les patientes triple négatives présentant des mutations de *BRCA1* et *BRCA2* (Gelmon *et al*, 2011).

Entre 10 et 15 % des patientes triple négatives expriment le récepteur aux androgènes (RA) (Niemeier *et al*, 2010). Une analyse de l'expression génique des patientes triple négatives a permis de mettre en évidence 6 sous-types de cancers du sein triple négatif

(Lehmann *et al*, 2011), dont le sous-type luminal RA (LRA). Le but étant de cibler ce groupe de patientes triple négatives avec une thérapie anti-androgénique. Des essais cliniques très prometteurs sont d'ailleurs en cours et montrent déjà les bénéfices d'un blocage des androgènes chez les patientes LRA avec par exemple l'utilisation du bicalutamide, un bloquant de l'activité des androgènes au niveau de leur récepteur (Gucalp *et al*, 2013).

Les cancers du sein n'étaient pas initialement considérés comme étant une maladie immunogénique. Cependant, il a été montré que chez les patientes triple négatives, il y avait des taux significativement plus élevés de lymphocytes infiltrant la tumeur (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*, TILs) (Ibrahim *et al*, 2014) et que ce taux de lymphocytes était corrélé à la réponse des patientes triple négatives aux chimiothérapies (Ono *et al*, 2012). L'immunomodulation pourrait donc devenir une nouvelle approche pour le traitement des patientes triple négatives. Par exemple, il a été montré que les cancers du sein triple négatif présentent une expression élevée du gène codant la protéine PD-L1 (*program death-ligand 1*) (Mittendorf *et al*, 2014). Le récepteur de PD-L1, PD-1, se situe à la surface des lymphocytes T et lorsqu'il est associé à son ligand, cela transmet un signal permettant l'inhibition de l'activation du lymphocyte. Des inhibiteurs de la voie de signalisation PD-1 sont en phase de test dans des essais cliniques sur des patientes triple négatives et montrent des résultats très prometteurs. Par exemple, l'utilisation d'un anticorps anti PD-1, le pembrolizumab, montre une activité thérapeutique significative (16 % de réponse partielle) dans un essai clinique de phase Ib (Nanda *et al*, 2015).

De nombreux progrès sont donc en cours dans le traitement de résistances aux thérapies hormonales, cependant, le traitement des cancers du sein triple négatifs reste un important challenge. En effet, l'hétérogénéité des patientes triple négatives complique l'étude de nouvelles drogues et à ce jour, les approches les plus prometteuses sont l'immunothérapie, les inhibiteurs de PARP et de la voie des RA. D'autre part, les chercheurs continuent leurs études afin de découvrir des biomarqueurs permettant de prédire les résistances aux traitements déjà existants mais également de définir de nouvelles cibles spécifiques pour des patientes triple négatives. En effet, afin de prévenir l'apparition de résistances et de mieux cibler les sous-populations de patientes qui bénéficient de traitements ciblés, il conviendra dans le futur de définir des biomarqueurs cellulaires et moléculaires sur la tumeur primaire, les métastases et/ou dans le sang circulant. L'émergence de la médecine personnalisée constitue donc un véritable défi. C'est pourquoi de nombreuses équipes de recherche ont choisi d'orienter leurs travaux vers l'autophagie, un mécanisme dont les cellules disposent

pour résister à différents stress, et dont la dérégulation a été associée à différentes pathologies telles que les maladies neurodégénératives ou encore le cancer. Cependant, afin de mieux comprendre le lien très complexe qui existe entre cancers du sein et autophagie, l'identification de protéines régulant ce mécanisme est devenu un enjeu majeur pour ainsi développer de nouvelles cibles thérapeutiques.

2. Autophagie et cancer du sein

2.1 Autophagie

2.1.1 Définition générale

L'autophagie, qui vient du grec *αυτο* « soi-même » et *φαγειν* « manger », signifie littéralement « se manger soi-même ». Ce mécanisme permet la dégradation du contenu cytoplasmique par le biais des lysosomes. Les cellules possèdent également un autre système de dégradation indépendant appelé protéasome, qui permet de dégrader de manière ciblée des protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes. L'autophagie est, quant à elle, la seule voie qui permet de dégrader massivement des macromolécules ou des organites. Le mécanisme autophagique a tout d'abord été décrit par Clark, dans le foie de souris nouveau-nées par microscopie électronique (Clark, 1957), mais c'est il y a 50 ans que le terme « autophagie » a été introduit pour la première fois par De Duve (l'un des trois lauréats du Nobel de médecine en 1974) et Wattiaux, lors d'une conférence sur les lysosomes (De Duve & Wattiaux, 1966). Il apparaissait alors que ce mécanisme était un processus de dégradation en masse de constituants cellulaires. La connaissance de ce phénomène est cependant restée limitée jusqu'aux travaux d'Ohsumi (lauréat du Nobel de médecine en 2016) chez la levure, qui ont permis au début des années 1990 d'identifier les gènes de l'autophagie (Tsukada & Ohsumi, 1993).

Dorénavant, il est établi que l'autophagie est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire au cours duquel des protéines, des organites et des constituants cytoplasmiques endommagés sont dégradés et recyclés au sein du lysosome. Ainsi, des dysfonctionnements de l'autophagie sont associés à de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives, le diabète, le vieillissement, ou encore le cancer (Levine & Klionsky, 2004; Levine & Kroemer, 2008).

2.1.2 Différents types d'autophagie

Il existe trois types d'autophagie appelés macroautophagie, microautophagie et autophagie dépendante des chaperonnes (*chaperone-mediated autophagy*, CMA) (**Figure 3**). Ces différentes formes d'autophagie se caractérisent par leurs fonctions physiologiques et leur voie de dégradation lysosomale. Les micro- et macroautophagie permettent la dégradation de larges structures par le biais de mécanismes sélectifs et non sélectifs. L'autophagie dépendante de protéines chaperonnes permet, quant à elle, uniquement la dégradation de protéines solubles, grâce à des mécanismes sélectifs (Mizushima & Komatsu, 2011).

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 autophagiques et est caractérisée par la formation d'une vacuole d'autophagie, appelée autophagosome, qui va ensuite fusionner avec le lysosome afin de dégrader son contenu (**Figure 3A**).

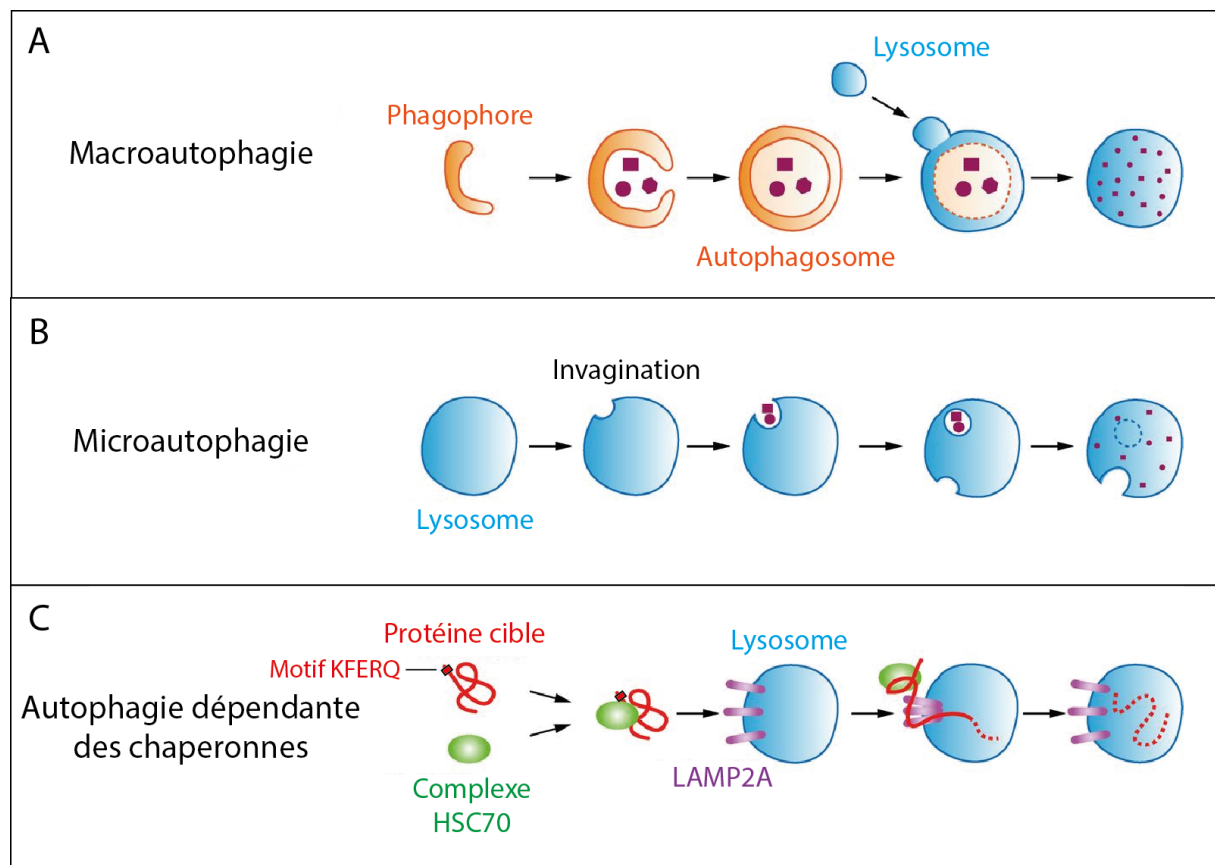


Figure 3 : Représentation des trois types d'autophagie. (A) La macroautophagie est caractérisée par la séquestration du contenu cytoplasmique dans des vésicules d'autophagie appelées autophagosomes. Cet autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome pour permettre la dégradation de son contenu par les hydrolases lysosomales. (B) La microautophagie est caractérisée par l'invagination directe du lysosome pour y recueillir le contenu à dégrader. (C) 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. Modifiée d'après (Okamoto, 2014).

Au contraire, la microautophagie et la CMA ne requièrent pas la formation d'une vacuole autophagique et permettent la dégradation directe des constituants cytoplasmiques par le lysosome.

La microautophagie est caractérisée par la séquestration d'une partie du cytoplasme directement par le lysosome chez le mammifère (Li *et al*, 2012) (**Figure 3B**). La microautophagie peut permettre une dégradation non sélective, par l'élimination aléatoire de substrats solubles contenus dans le cytoplasme, mais peut également permettre une dégradation sélective en ciblant la dégradation d'organites tels que noyaux (micronucléophagie) (Millen *et al*, 2009) ou mitochondries (micromitophagie) (Kissová *et al*, 2007), fréquemment observées chez la levure. Pour la dégradation de constituants cytoplasmiques et de petites particules, le lysosome (mammifères) ou la vacuole (plantes et mycètes) forme une invagination tubulaire appelée tube autophagique pour capturer des portions du cytoplasme. Dans le cas de microautophagie sélective, une protrusion en forme de bras est formée afin de permettre la capture des organites cibles situés à proximité de la vacuole. Ce processus est induit par la vacuole suite à la réception de signaux émis par les organites cibles.

La CMA permet la dégradation sélective de protéines endommagées ou anormales possédant dans leur séquence un motif « KFERQ » (Dice, 2007) (**Figure 3C**). La CMA est un processus multi-étapes qui nécessite tout d'abord, la reconnaissance des protéines cibles *via* le motif KFERQ, par la forme constitutivement exprimée de la protéine de choc thermique de 70 kDa (*constitutively expressed form of heat shock protein of 70 kDa*, HSC70) (Chiang *et al*, 1989). Cette protéine chaperonne forme ensuite un complexe avec d'autres protéines co-chaperonnes, pour lui permettre d'interagir avec la protéine membranaire associée au lysosome 2A (*lysosome-associated membrane protein 2A*, LAMP2A) qui se situe sur la face cytoplasmique de la membrane lysosomale (Agarraberes & Dice, 2001). La protéine substrat est alors dénaturée avant sa translocation au sein du lysosome, au travers d'un translocon formé par les multiples segments transmembranaires de LAMP2A (Salvador *et al*, 2000).

2.2 Mécanismes cellulaire et moléculaire de la macroautophagie

2.2.1 Mécanisme cellulaire

La macroautophagie est un processus conservé de la levure aux mammifères et requiert l'intervention de plus de 30 protéines appelées ATG (*Autophagy-related*) (Yang & Klionsky,

2009). Les gènes codant ces protéines ont tout d'abord été découverts chez la levure (Tsukada & Ohsumi, 1993) mais possèdent pour la plupart leurs homologues chez les mammifères. Les protéines ATG peuvent agir seules ou en complexe au niveau des différentes étapes du processus autophagique. En effet, l'autophagie est un processus très complexe, qui comporte plusieurs étapes : (1) initiation et (2) nucléation qui consistent en la formation d'une double membrane nommée phagophore (**Figure 4 ; étapes 1 et 2**); (3) l'élongation du phagophore qui va permettre la formation d'une vésicule fermée à double membrane, appelée autophagosome et conduire à l'inclusion des constituants cytoplasmiques à dégrader (**Figure 4 ; étape 3**); (4) La fusion de l'autophagosome avec un lysosome pour former l'autophagolysosome (**Figure 4 ; étape 4**) qui conduira à la (5) dégradation du matériel cytoplasmique contenu dans l'autophagolysosome ainsi que de la membrane interne de la vésicule par les enzymes lysosomales (**Figure 4 ; étape 5**). L'autophagie se termine ainsi par le recyclage du contenu dégradé pour la synthèse de macromolécules et la production d'énergie pour la cellule.

L'autophagie est un processus dynamique au cours duquel les autophagosomes sont produits puis dégradés suite à leur fusion avec le lysosome. On appelle cela le flux autophagique. Le nombre d'autophagosomes visibles au sein de la cellule n'est donc pas directement corrélé au flux autophagique mais représente l'autophagie à un moment donné. En effet, un nombre important d'autophagosomes dans la cellule peut rendre compte d'une augmentation du flux autophagique ou d'une diminution de leur dégradation par les lysosomes. Afin d'étudier le flux autophagique, il est donc nécessaire d'utiliser des inhibiteurs de ce mécanisme afin de comparer le nombre d'autophagosomes présents dans la cellule avant et après traitement pour déterminer l'intensité du flux autophagique.

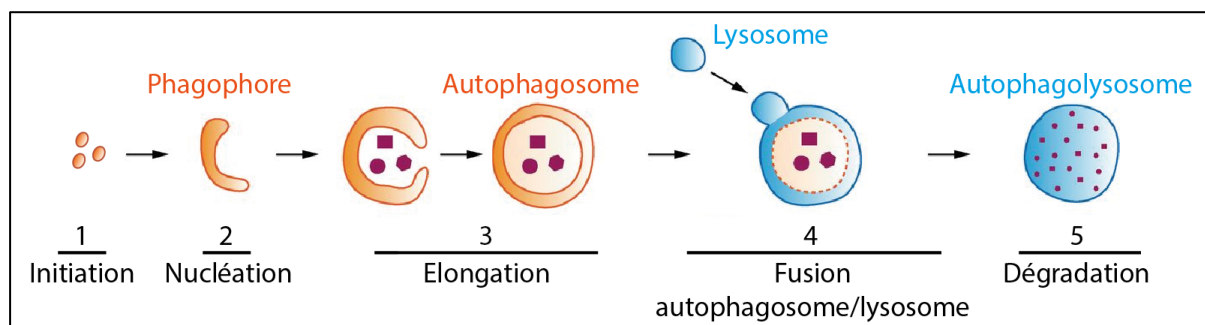


Figure 4 : Différentes étapes de l'autophagie. L'autophagie est un processus multi-étapes qui va être initié par formation (1) et la nucléation (2) d'une structure à double-membrane appelée phagophore. Le phagophore va ensuite s'allonger pour séquestrer le contenu cytoplasmique et ainsi former une vacuole d'autophagie ou autophagosome (3). L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome (4) et ainsi former l'autophagolysosome dont le contenu sera dégradé et recyclé (5). Modifiée d'après Okamoto, 2014.

2.2.2 Induction de l'autophagie

Comme décrit précédemment, l'autophagie présente un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, un taux basal d'autophagie permet le maintien de l'homéostasie des cellules, *via* notamment l'élimination et le recyclage des organites et protéines non fonctionnels. Ce mécanisme peut également être induit par différents stress, comme une carence en nutriments ou un stress oxydatif pour permettre ainsi la production de métabolites, qui seront ensuite utilisés dans des processus anaboliques pour produire de l'énergie et permettre à la cellule de résister à ces différents stress et de survivre (pour une revue, voir Kroemer *et al*, 2010). Le statut nutritionnel, les hormones, la température, l'hypoxie et la densité cellulaire sont d'autres importants modulateurs du flux autophagique (Mizushima & Klionsky, 2007), montrant ainsi l'importance de la régulation d'un tel processus dans la vie des cellules. Néanmoins, lorsque le stress est trop important, l'autophagie peut conduire à la mort cellulaire par apoptose (mort cellulaire de type I) ou à la mort autophagique (mort cellulaire de type II) (Shimizu *et al*, 2004). La stimulation de l'autophagie par le stress oxydant ou une carence en nutriments implique différentes voies de signalisation, qui seront détaillées dans les paragraphes suivants.

Chez les mammifères, l'induction de l'autophagie est régulée par des protéines ATG, agissant seules ou en complexe. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement au complexe ULK (*unc-51 like autophagy activating kinase*), qui joue un rôle dans l'initiation, aux protéines WIPI (*WD-repeat domain phosphoinositide-interacting*) qui jouent un rôle dans l'étape de nucléation et à la protéine ATG9A qui possède un rôle dans l'étape d'élongation.

2.2.2.1 Régulation de l'étape d'initiation

L'activation des complexes ULK et PI3KC3 (PI3K de classe III, aussi connu sous le nom de complexe BECLIN1) permet de réguler l'étape d'initiation de l'autophagie.

Le complexe ULK est composé de la kinase ULK1 et/ou ULK2, de FIP200 (*FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*), d'ATG13 et d'ATG101 (Akers *et al*, 2012). La composition de ce complexe n'est pas modifiée en fonction du statut en nutriments mais l'état de phosphorylation des protéines de ce complexe déterminera s'il y aura induction ou non du processus autophagique. Cette régulation est coordonnée par deux kinases : le complexe mTORC1 et la protéine kinase AMPK, activée par un taux élevé d'adénosine monophosphate (AMP) (*AMP-activated protein kinase*). Le complexe mTORC1 est composé de la sous-unité

catalytique mTOR, de RAPTOR (*regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*) et de mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*) et peut s'associer avec les protéines PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40kDa*), DEPTOR (*DEP domain containing mTOR-interacting protein*) et le complexe Tti1/Tel2 (pour une revue, voir Laplante & Sabatini, 2012). L'AMPK est, quant à elle, une kinase qui détecte le statut énergétique au sein de la cellule. En effet, elle s'active lorsque le taux d'AMP dans la cellule augmente, ce qui reflète la diminution du taux d'ATP (adénosine triphosphate) disponible dans la cellule.

Lors de conditions riches en nutriments, le complexe mTORC1 est lié au complexe ULK par association directe entre RAPTOR et ULK1/2 (Hosokawa *et al*, 2009) (**Figure 5**). La forme active de mTORC1 phosphoryle alors ULK1 au niveau de la sérine 757 (Kim *et al*, 2011) et ATG13 au niveau de la sérine 258 (Puente *et al*, 2016), pour ainsi inhiber le complexe ULK (Ganley *et al*, 2009).

En réponse à une carence en nutriments, le complexe mTORC1 est inhibé par l'activation d'AMPK. En effet, AMPK phosphoryle RAPTOR (Gwinn *et al*, 2008) mais phosphoryle également le suppresseur de tumeurs TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), aboutissant à l'inactivation de Rheb (*ras homolog enriched in brain*) qui interagit et active mTORC1 (Inoki *et al*, 2003). L'inactivation de mTORC1 provoque sa dissociation du complexe ULK (Hosokawa *et al*, 2009). Le complexe ULK est alors régulé par AMPK, qui active ULK1 par phosphorylation, notamment au niveau des sérines 317 et 777 (Kim *et al*, 2011) et ATG13 par phosphorylation de sa sérine 224 (Puente *et al*, 2016) puis ULK1 s'autophosphoryle au niveau de sa thréonine 180 (Lazarus *et al*, 2015).

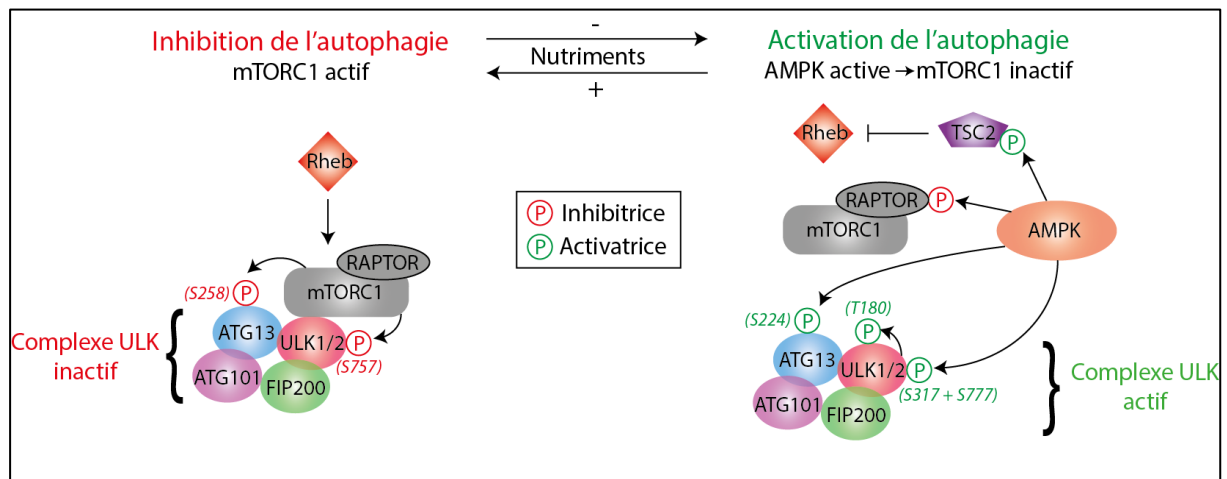


Figure 5 : Régulation du complexe ULK par mTORC1 et AMPK. En conditions riches en nutriments, mTORC1 est activée par Rheb et s'associe au complexe ULK *via* son interaction avec ULK1/2. Le complexe mTORC1 inhibe alors le complexe ULK par phosphorylation d'ULK1/2 et d'ATG13. Lors d'une carence en nutriments, mTORC1 est inactivée par AMPK qui phosphoryle RAPTOR et TSC2 aboutissant à l'inactivation de Rheb. Le complexe mTORC1 se dissocie alors d'ULK1/2. AMPK active ensuite le complexe ULK de manière directe en phosphorylant ULK1/2 et ATG13. De plus, ULK1/2 est capable de s'autophosphoryler pour stimuler sa propre activité.

L'activation du complexe PI3KC3 régule également l'initiation de l'autophagie. Ce complexe est composé de la kinase lipidique VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*) et des protéines BECLIN1, P150 et ATG14L. L'activation du complexe ULK permet la phosphorylation de la protéine AMBRA1 (*activating molecule in Beclin 1-related autophagy 1*), qui interagit avec BECLIN1. Cette phosphorylation induite par le complexe ULK permet la relocalisation du complexe BECLIN1 au niveau du site de l'initiation de l'autophagie (Di Bartolomeo *et al*, 2010). Ceci favorise l'interaction de BECLIN1 avec VPS34 (Fimia *et al*, 2007). De plus, ULK1 peut phosphoryler directement BECLIN1 au niveau de sa sérine 14 pour favoriser l'activité de VPS34 (Russell *et al*, 2013). Ces différents évènements permettent l'induction de l'étape de nucléation.

L'activation des complexes ULK et PI3KC3 est hautement régulée et de nombreuses voies de signalisation sont impliquées en fonction du stress exercé sur la cellule. Dans la suite de ce manuscrit, les voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'autophagie suite à une carence en nutriments ou un stress oxydant seront détaillées, car elles ont été décrites comme jouant un rôle important dans les cellules cancéreuses.

2.2.2.1.1 Régulation de l'autophagie par une carence en nutriments

La carence en nutriments est la méthode physiologique la plus efficace connue à ce jour pour induire l'autophagie et correspond à une absence d'acides aminés et de glucose (Boya *et al*, 2005). L'induction de l'autophagie par une carence en nutriments est régulée par mTOR et AMPK (comme décrit précédemment), mais également par les sirtuines.

Les sirtuines sont des désacétylases dépendantes du NAD⁺ impliquées dans la détection de stress environnementaux (pour une revue, voir Haigis & Sinclair, 2010). L'induction de l'autophagie par une carence en nutriments nécessite la protéine nucléaire SIRT1 (sirtuine 1). En effet, SIRT1 peut désacétyler les promoteurs des gènes *ATG5*, *ATG7*, *LC3B* ou encore le facteur de transcription FOXO3A (*Factor forkhead box O3a*) (Lee *et al*, 2008, 1; Morselli *et al*, 2010). La désacétylation de FOXO3A permet sa translocation dans le noyau et favorise l'expression de BNIP3, une protéine pro-autophagique (Kume *et al*, 2010) (**Figure 6A**). Une autre sirtuine, SIRT2, se dissocie de FOXO1 lors d'une carence en sérum, favorisant ainsi l'acétylation de FOXO1 et permettant son interaction avec ATG7 pour stimuler l'autophagie (Zhao *et al*, 2010) (**Figure 6B**).

L'AMPK est activée suite à une baisse du statut énergétique dans la cellule et à une augmentation du ratio AMP/ATP. Cependant, l'AMPK peut également être activée par d'autres kinases en amont qui détectent différents stress, telles que LKB1 (*liver kinase B1*) qui détecte une baisse en facteurs de croissance (Woods *et al.*, 2003) ou CaMKK β (*calcium/calmodulin kinase kinase- β*) activée par une augmentation du taux de calcium cytosolique (Hawley *et al.*, 2005) (**Figure 6C et D**). Lors d'une carence en nutriments, l'AMPK et SIRT1 agissent de manière coordonnée pour induire l'autophagie. En effet, SIRT1 peut désacétyler LKB1, afin d'amplifier l'activité de kinase de LKB1 et stimuler sa translocation du noyau vers le cytoplasme, où elle activera l'AMPK (Lan *et al.*, 2008). De plus, l'AMPK peut stimuler l'activité de SIRT1 de manière indirecte en augmentant la concentration de NAD⁺ (Cantó *et al.*, 2009).

Le complexe mTORC1 peut être, quant à lui, inhibé par différents mécanismes en fonction de la carence. En effet, comme décrit précédemment, mTORC1 peut être inhibée par AMPK lorsque la cellule présente une baisse de la quantité d'ATP. D'autres acteurs agissent lors d'une carence en facteurs de croissance. En effet, lorsque la cellule est en présence de facteurs de croissance, les kinases AKT et ERK1/2 sont actives et phosphorylent TSC1/TSC2 pour les inhiber et ainsi activer mTORC1. De plus, AKT peut phosphoryler RAPTOR pour induire également l'activation de mTORC1 (Foster *et al.*, 2010). Les acides aminés, quant à eux, activent mTORC1 par les protéines de la famille des GTPases RAG, qui interagissent avec RAPTOR pour recruter le complexe mTORC1 à la surface des lysosomes, où il sera activé par Rheb (Sancak *et al.*, 2008) (**Figure 6E**).

D'autres kinases peuvent également être impliquées dans la régulation de l'autophagie en réponse à une carence en nutriments. Par exemple, la kinase P38 α MAPK (*P38 α mitogen-activated protein kinase*) est capable d'inhiber l'induction de l'autophagie suite à une carence en nutriments. En effet, cette kinase interagit avec P38IP (*P38 interacting protein*), qui est nécessaire au transport d'ATG9A lors de l'induction de l'autophagie (Webber & Tooze, 2010).

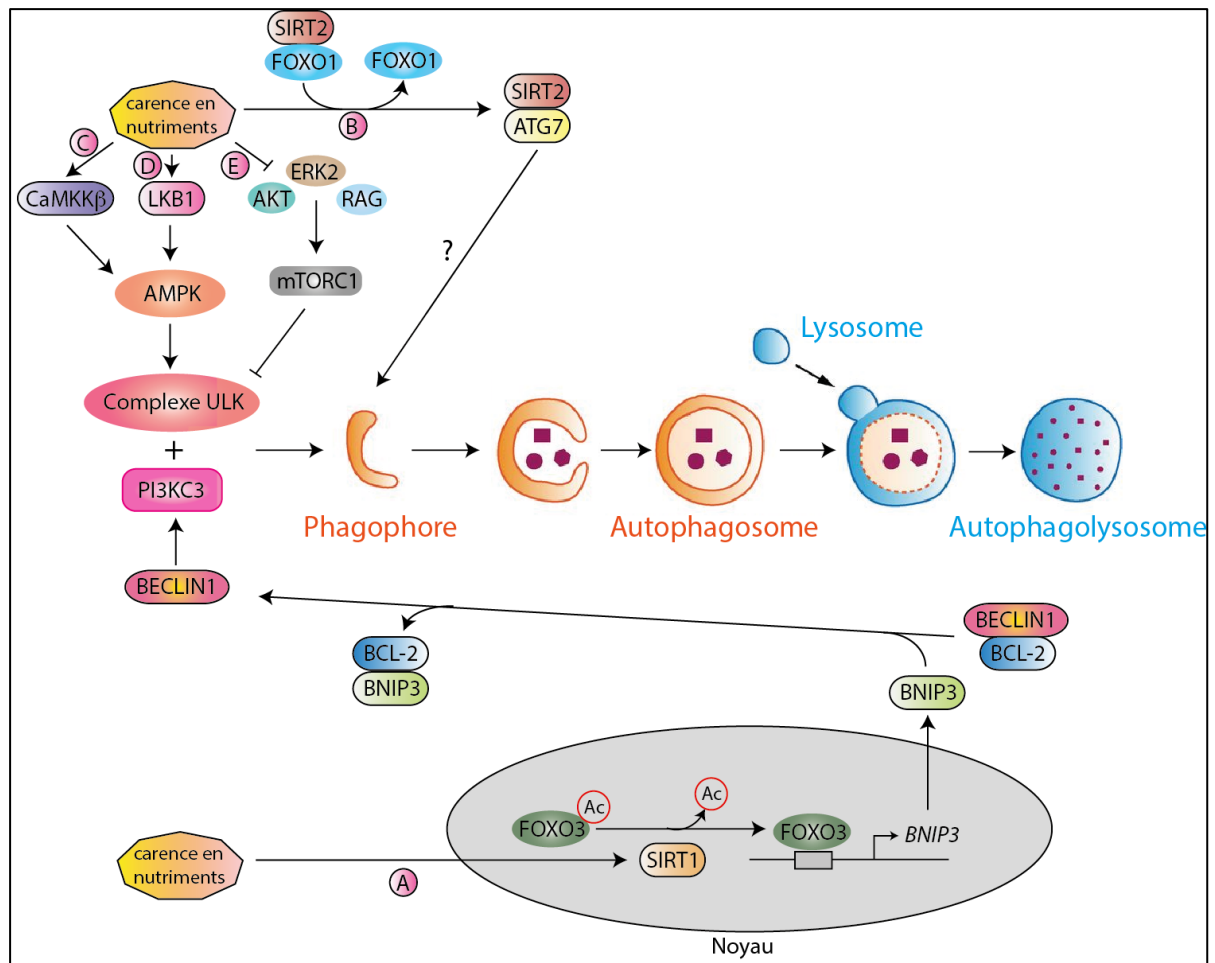


Figure 6 : Induction de l'autophagie par une carence en nutriments. (A) Une carence en nutriments active SIRT1, permettant la désacétylation du facteur de transcription FOXO3A, favorisant ainsi la transcription de *BNIP3*. *BNIP3* se lie à BCL-2 par compétition avec BECLIN1, permettant la libération de BECLIN1 et d'activer le complexe PI3KC3 pour permettre l'activation de l'autophagie. (B) Lors d'une carence en sérum, SIRT2 se dissocie de FOXO1 et interagit avec ATG7 pour stimuler l'autophagie. La kinase AMPK peut être activée par (C) une augmentation du taux de calcium intracellulaire *via* la kinase CaMKK β ou encore (D) la kinase LKB1 qui détecte une baisse d'énergie. L'activation d'AMPK permettra ensuite d'activer le complexe ULK, permettant l'induction de l'autophagie. (E) Les kinases AKT et ERK2 sont inactives en absence de facteurs de croissance et l'absence d'acides aminés inactive les protéines RAG. Ces protéines inactivées ne pourront donc pas activer le complexe mTORC1, permettant ainsi l'induction de l'autophagie. Modifiée d'après Okamoto, 2014.

2.2.2.1.2 Régulation de l'autophagie par le stress oxydant

L'autophagie peut être induite par un stress oxydant, qui correspond à un taux élevé d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et ainsi permettre la réduction des dommages provoqués aux lipides, protéines et ADN, par ces composés. Les ROS incluent les anions d'oxygène et des radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH \cdot), l'anion hyperoxide (O $_2^-$) et le peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$). La cellule possède deux voies majeures de production de ROS : la mitochondrie (qui produit des ROS par le biais de la respiration) et l'oxydase NADPH (NOX). Il semble que les mitochondries régulent principalement l'autophagie par le biais des ROS (Chen *et al*, 2007), alors que NOX serait

plutôt impliquée dans l'induction de la dégradation sélective des bactéries par autophagie (Huang *et al*, 2009). Les principaux ROS capables de réguler l'activation de l'autophagie sont O_2^- et H_2O_2 .

H_2O_2 est l'inducteur de l'autophagie principal car il est relativement stable comparé aux autres ROS. Il a été montré qu'une carence en nutriments induit une accumulation d' H_2O_2 dans les mitochondries, un évènement essentiel à l'induction de l'autophagie (Zhang *et al*, 2009). De plus, ATG4A et ATG4B peuvent être oxydées par H_2O_2 , ce qui inhibe leur activité de protéase et ainsi favorise la formation d'autophagosomes en facilitant la lipodation des protéines de la famille ATG8 (Scherz-Shouval *et al*, 2007) (**Figure 7A**).

L'augmentation du taux d' O_2^- dans les mitochondries, induit par un traitement avec du sélénite de sodium, un agent anti-cancéreux qui provoque l'augmentation de calcium intramitochondrial induisant la synthèse de ROS par les mitochondries, conduit à des dommages mitochondriaux et favorise la mitophagie et la mort cellulaire au sein de gliomes malins (Kim *et al*, 2007) (**Figure 7B**). De plus, une carence prolongée en glucose et en acides aminés provoque également la production d' O_2^- . Cette accumulation intracellulaire d' O_2^- est alors suffisante pour induire l'autophagie (Chen *et al*, 2009).

Il existe différentes voies impliquées dans l'induction de l'autophagie par les ROS. Par exemple, les ROS générées par les mitochondries peuvent activer l'AMPK de manière indépendante du ratio AMP/ATP (Emerling *et al*, 2009). L'oxydation d'AMPK par H_2O_2 induit alors un réarrangement allostérique de cette kinase, qui faciliterait son activation induite par l'AMP (Zmijewski *et al*, 2010) (**Figure 7C**). Principalement, c'est l'activation des MAPK suite à l'accumulation de ROS dans la cellule qui permet l'induction de l'autophagie. En effet, un taux élevé d' H_2O_2 active JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*), qui phosphoryle BCL-2, libérant ainsi BECLIN1 de son interaction inhibitrice avec BCL-2, et permet l'induction de l'autophagie (Wong *et al*, 2010) (**Figure 7D**).

L'hypoxie est une limitation ou une privation de l'accès à l'oxygène, couramment observée dans les cancers, due à une vascularisation limitée. HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*) est un facteur de transcription activé lors de conditions pauvres en oxygène mais également lorsque les mitochondries produisent des ROS. Il permet de contrôler la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et la survie cellulaire, comme *BNIP3* et *NIX*. Ces protéines permettent de réguler positivement l'autophagie par compétition de liaison avec BCL-2, libérant ainsi BECLIN1 pour lui permettre d'induire l'autophagie (Bellot *et al*, 2009) (**Figure 7E**).

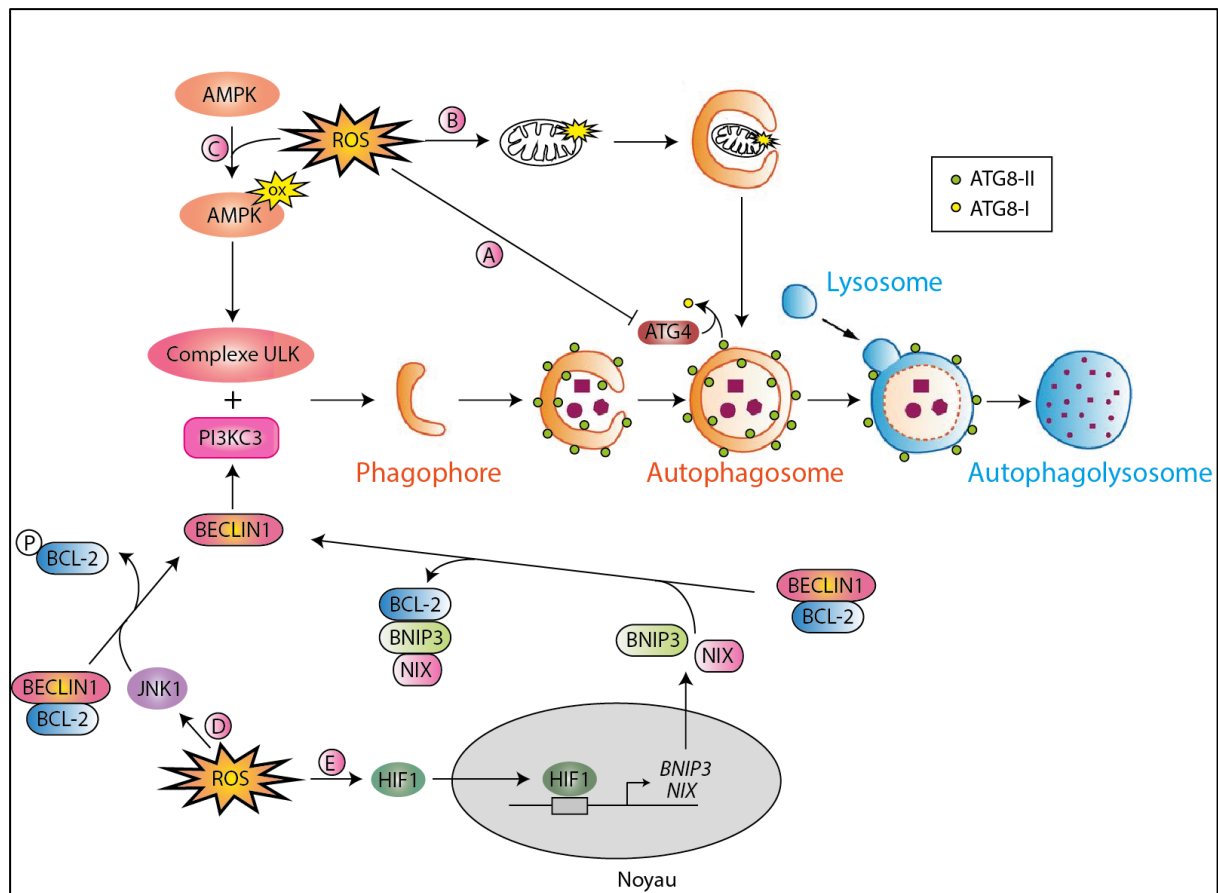


Figure 7 : Induction de l'autophagie par le stress oxydant. (A) Le stress oxydant peut oxyder ATG4, pour favoriser l'autophagie. (B) Les ROS peuvent provoquer des dommages mitochondriaux et induire la mitophagie. (C) Les ROS peuvent conduire à l'oxydation de l'AMPK, ce qui augmente son activité kinase pour favoriser l'activation du complexe ULK. (D) Le stress oxydant active la kinase JNK1 qui phosphoryle BCL-2 pour libérer BECLIN1 de son interaction inhibitrice avec BCL-2, et ainsi favoriser l'activation de PI3KC3. (E) L'hypoxie active le facteur de transcription HIF1 qui induit l'expression de BNIP3 et NIX. Ces protéines se lient à BCL-2 et libèrent BECLIN1, favorisant ainsi l'activation du complexe PI3KC3. Modifiée d'après Okamoto, 2014.

2.2.2.2 Régulation de l'étape de nucléation : les protéines WIPI

Une fois que les complexes ULK et PI3KC3 sont activés et recrutés au niveau du site de formation de l'autophagosome, ils permettent la production localisée de PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate). Ceci permet d'induire l'étape de nucléation de la membrane, le recrutement d'autres protéines ATG mais également d'effecteurs spécifiques de PI3P, tels que la protéine DFCP1 (*double FYVE-containing protein 1*) (Axe *et al*, 2008) ou encore les protéines WIPI (**Figure 8**). La famille des protéines WIPI contient 4 membres : WIPI1 à WIPI4 qui contiennent 7 répétitions de domaines WD (Proikas-Cezanne *et al*, 2004). Un domaine WD est un motif d'environ 40 acides aminés qui se termine souvent par le dipeptide tryptophane-acide aspartique (W-D). A ce jour, le rôle de la protéine WIPI3 demeure inconnu. La protéine WIPI4 joue un rôle dans la maturation de l'autophagosome (Lu *et al*, 2011) alors que les protéines WIPI1 et WIPI2 jouent un rôle dans l'étape de nucléation et viennent se

fixer spécifiquement sur les PI3P au niveau de la membrane. En effet, WIPI1 est rapidement attirée par la production de PI3P et sa liaison au niveau de la naissance de l'autophagosome est nécessaire pour la lipodation de LC3 aux PE (phosphatidyléthanolamine) (Mauthe *et al*, 2011), qui est un élément primordial à l'expansion du phagophore. La fonction de WIPI2 est également essentielle à la lipodation de LC3 (Polson *et al*, 2010). En effet, il a été montré que WIPI2 peut se lier spécifiquement à ATG16L1, recrutant ainsi le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, indispensable à la lipodation de LC3 (Dooley *et al*, 2014). Les rôles de WIPI1 et WIPI2 dans l'étape de nucléation de la membrane autophagosomale ont été montrés dans des conditions pauvres en nutriments mais n'ont pas pu être démontrés dans le cas d'une induction de l'autophagie par déprivation en glucose (McAlpine *et al*, 2013). Il semblerait donc que l'activation de l'autophagie par des conditions pauvres en glucose soit indépendante de la production de PI3P.

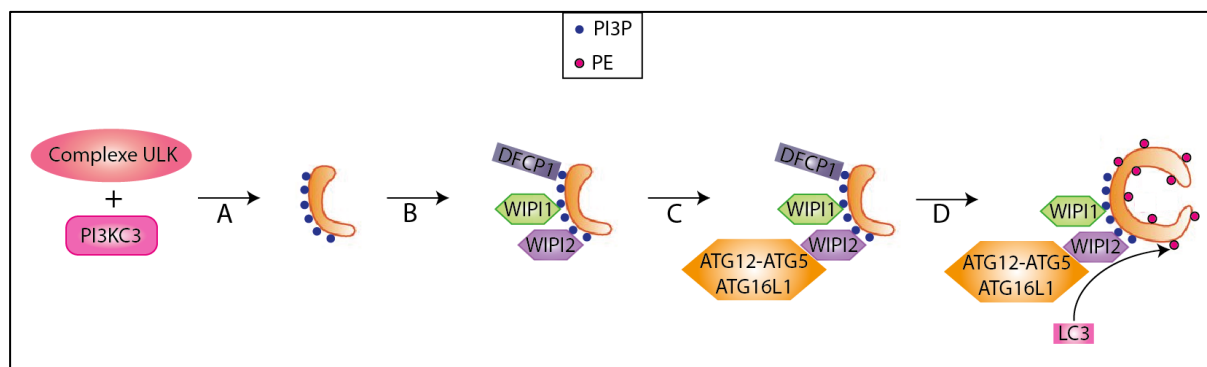


Figure 8 : Régulation de l'étape de nucléation par les protéines WIPI. (A) Lors d'une carence en nutriments, les complexes ULK et PI3KC3 sont activés et permettent la production de PI3P au niveau du site de formation de l'autophagosome. (B) Le PI3P recrute des effecteurs spécifiques tels que DFCP1 ou les protéines WIPI1 et WIPI2. (C) Les protéines WIPI1 et WIPI2 sont essentielles pour le recrutement d'autres protéines ATG pour réguler l'expansion de l'autophagosome. En effet, WIPI2 recrute le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 par liaison directe avec ATG16L1. (D) Ces étapes aboutissent au recrutement et à la lipodation de LC3, permettant ainsi l'expansion du phagophore. Modifiée d'après Okamoto, 2014.

2.2.2.3 Régulation de l'élongation du phagophore : ATG9A

Après l'étape de nucléation, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 est recruté au niveau de la membrane, où il joue un rôle de ligase type E3 pour activer la lipodation de LC3. Cependant, l'origine des lipides qui va permettre de former l'autophagosome reste encore incertaine. A ce jour, nous savons que les autophagosomes dérivent de vésicules provenant de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique ainsi que des endosomes. Il existe trois voies impliquées dans l'expansion du phagophore : PI3KC3, deux protéines de la famille RAB : RAB1 (Zoppino *et al*, 2010) et RAB33B (Itoh *et al*, 2008), ainsi qu'ATG9A. Le point

commun de ces voies est leur localisation au niveau de l'appareil de Golgi : alors que les protéines RAB et ATG9A peuvent jouer un rôle dans le trafic des vésicules vers le site de formation des autophagosomes, l'activité de PI3KC3 serait inhibée par la séquestration de BECLIN1 au niveau du Golgi (Lamb *et al*, 2013). Dans ce paragraphe, nous décrirons succinctement le rôle d'ATG9A dans l'étape de l'expansion du phagophore. En effet, les rôles de cette protéine seront plus amplement développés dans la section « 2.3 ».

ATG9A est à ce jour, la seule protéine ATG transmembranaire connue. Cette protéine est nécessaire à la fois dans les étapes précoces et tardives de l'autophagie et demeure la meilleure candidate pour délivrer des vésicules et des lipides pour permettre l'expansion des membranes. Chez les mammifères, lors de conditions riches en nutriments, ATG9A est localisée au niveau du Golgi-*trans* mais également au niveau des endosomes de recyclage et tardifs (Orsi *et al*, 2012). En réponse à une carence en nutriments, la localisation d'ATG9A sera favorisée vers les endosomes plutôt qu'au niveau du Golgi. Cette redistribution d'ATG9A est régulée par le complexe ULK (Young *et al*, 2006) mais également par la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Webber & Tooze, 2010). WIPI2, quant à elle, joue un rôle dans le retour d'ATG9A des phagophores vers le Golgi (Orsi *et al*, 2012). Cependant, la fonction d'ATG9A n'est pas totalement explicitée dans les cellules de mammifères même s'il semblerait que son changement de localisation permettrait à cette protéine de distribuer des lipides d'un compartiment à l'autre et ainsi permettre la formation ainsi que l'expansion de la membrane autophagique.

2.2.3 Elongation et fermeture des autophagosomes

Suite à l'étape de nucléation, le phagophore va s'allonger pour séquestrer le contenu cytoplasmique et former l'autophagosome. Cette étape est appelée étape d'élongation et se termine par la fermeture de la vacuole autophagique. Elle requiert l'intervention de deux systèmes de conjugaison : ATG12-ATG5-ATG16L1 et ATG8/LC3-PE. 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 est 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).

2.2.3.1 Système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1

La protéine ATG12 est synthétisée avec un résidu glycine en position C-terminale. Elle est activée par ATG7 (enzyme E1) puis transférée sur ATG10 (enzyme E2) pour finalement être conjuguée sur la protéine ATG5 (Mizushima *et al*, 1998). Le complexe ATG12-ATG5 interagit ensuite avec ATG16L1 pour former le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (Fujioka *et al*, 2010) (**Figure 9**). Ce complexe est formé de manière constitutive et indépendante de la quantité de nutriments.

Comme cité précédemment, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 est recruté au niveau de la membrane des phagophores et est nécessaire à la lipitation de LC3. On retrouve ce complexe de manière prédominante au niveau de la surface externe de cette membrane et il se dissocie de cette dernière dès la finalisation de l'autophagosome (Mizushima *et al*, 2001).

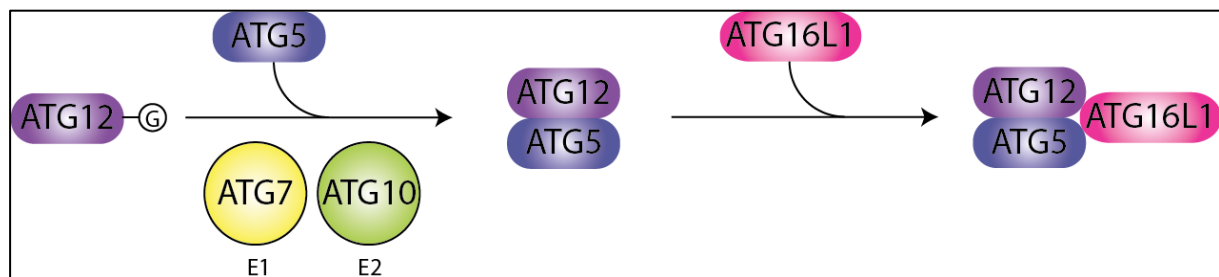


Figure 9 : Système de conjugaison du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1. La protéine ATG12 est constitutivement synthétisée avec un résidu glycine en position C-terminale. Elle peut ainsi être prise en charge par ATG7 pour son activation (enzyme E1), puis transférée sur ATG10 (enzyme E2) pour se conjuguer avec ATG5. Le complexe ATG5 interagit ensuite avec ATG16L1, pour former le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1.

2.2.3.2 Système de conjugaison ATG8/LC3

2.2.3.2.1 Les protéines de la famille ATG8

Chez les mammifères, il existe plusieurs homologues à la protéine de levure Atg8, classés en 2 sous-familles : la sous-famille LC3, contenant les protéines LC3A, LC3B et LC3C (He *et al*, 2003) et la sous-famille « *GABA_A receptor-associated protein* » (GABARAP), contenant les protéines GABARAP, GABARAP-like 1 (GABARAPL1), GABARAP-like 2 (GABARAPL2) aussi connu sous le nom de « *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa* » (GATE-16) et GABARAP-like 3 (GABARAPL3) (Xin *et al*, 2001). Cependant, à ce jour, seule l'existence du gène *GABARAPL3* a été mise en évidence, aucune étude n'ayant encore démontré la présence de la protéine GABARAPL3 chez l'homme (Xin *et al*, 2001)

Le gène *GABARAPL1* ou *GEC1* (*Glandular endothelial cell 1*) 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). Chez l'homme, la protéine GABARAPL1 présente 96% d'homologie avec la protéine GABARAPL3, 87% avec la protéine GABARAP et 61% avec la protéine GABARAPL2. Cette protéine présente néanmoins un pourcentage plus faible d'homologie avec la sous-famille LC3 : 31% d'homologie avec la protéine LC3A, 29% avec la protéine LC3B et 35% avec la protéine LC3C (Le Grand *et al*, 2011) (**Figure 10**).

GABARAPL1	MKFQYKEDHHPFYRKKKEGKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLDRKYLVPDLDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLDKCKYLVPDLDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLHRCVESAIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRKYLVPDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGAAVDPADRCKEVQQIRDQHPSKIPIVI IERYKGEKQLPVLDTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPIVI IERYKGEKQLPVLDTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFLLPPLDKTKFLVPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKRKAESERIDRFKNRIPVICEK-AEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFVFN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESVMYGL-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFVFN-NVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFLYIAYSDESVMYGL-117
GABARAPL2	MWIIIRKRIQLPSEKAIFFLVD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYSSENTFGF-117
LC3A	VKIIRRLQLNPTQAFLLVNHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYVMVYASQETFGLF-125
LC3B	IKIIRRLQLNANQAFLLVNHSMVSVSTPISEVYSEKDEDGFLYVMVYASQETFGLMGLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVLRAEAFYLLVNNKSLVMSATMAEIRDYKDEDGFVYMTYASQETFGLCLESAAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRIMLPPEKAIFFVFN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFLYVTVSSENTFGGR-117

Figure 10 : Alignement des séquences protéiques des 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.

De plus, les protéines de la famille ATG8 possèdent de fortes similarités au niveau de leur structure tridimensionnelle avec 2 hélices α au niveau de leur extrémité N-terminale, un feuillet β au niveau de leur extrémité C-terminale et une poche centrale proche de celle de l'ubiquitine (Shpilka *et al*, 2011) (**Figure 11**).

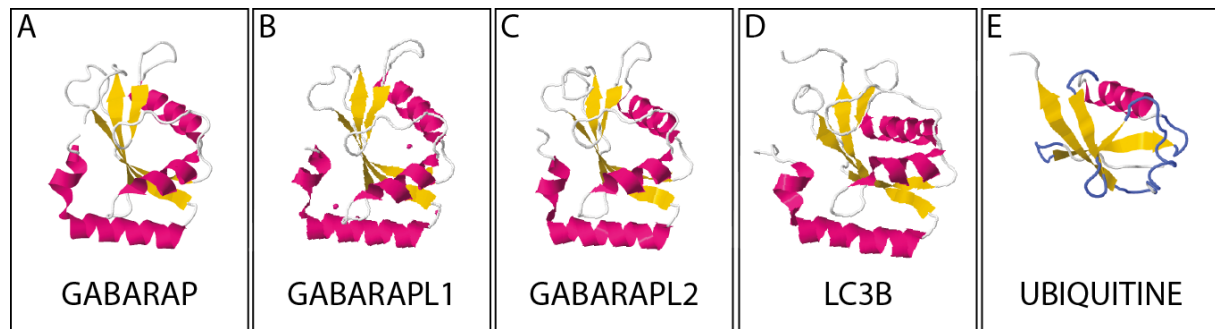


Figure 11 : Structure cristallographique des membres de la famille ATG8 ainsi que de l'UBIQUITINE. Toutes les protéines de la famille ATG8 partagent une structure proche de celle de l'ubiquitine, avec 2 hélices α supplémentaires au niveau de l'extrémité N-terminale. (A) GABARAP, Protein Data Bank (PDB) : 1EO6 ; (B) GABARAPL1, PDB : 2R2Q ; (C) GABARAPL2, PDB : 4C07 ; (D) LC3B, PDB : 1V49 ; (E) UBIQUITIN, PDB : 1UBI. Ces structures ont été obtenues à partir de la base de données RCSB (www.rcsb.org).

Les membres de la famille ATG8 ont tout d'abord été identifiés comme étant impliqués dans des processus de transport intracellulaire. En effet, GABARAP et GABARAPL1 participent au transport de protéines membranaires de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique, tels que les récepteurs GABA_A *via* leur interaction avec leur sous-unité $\gamma 2$ (Wang *et al*, 1999; Mansuy *et al*, 2004), le récepteur aux κ opioïdes pour GABARAPL1 (Chen *et al*, 2006) et le récepteur à la transferrine pour GABARAP (Green *et al*, 2002). De plus, GABARAP et GABARAPL2 jouent un rôle dans le transport du réticulum endoplasmique (ER) vers le Golgi et au sein du Golgi. En effet, GABARAP peut interagir avec la protéine PX-RCIS (*Phox homology-RhoGAP involved in the β -catenin-N-cadherin and NMDA receptor signaling*) et ainsi participer au transport du complexe N-cadhérine/ β -caténine de l'ER vers le Golgi (Nakamura *et al*, 2008) et GABARAPL2 a été impliquée dans le transport au sein du Golgi de la protéine GOS-28 (*Golgi SNARE protein 28*) (Sagiv *et al*, 2000). Les protéines LC3A et LC3B ont été, quant à elles, initialement identifiées dans le cerveau de rat comme étant des protéines co-purifiées avec des protéines associées aux microtubules (Mann & Hammarback, 1994), mais aucune implication directe de cette protéine n'a été reportée dans le transport membranaire.

2.2.3.2.2 Fonctions des membres de la famille ATG8 dans l'autophagie

Le premier lien entre membres de la famille ATG8 et autophagie a été établi chez la levure, où la seule protéine Atg8 a été identifiée comme étant un facteur essentiel de l'autophagie mais également pour le ciblage spécifique de composants cytoplasmiques vers la vacuole (Lang *et al*, 1998). En ce qui concerne les homologues de la famille ATG8 chez les mammifères, ils peuvent tous être localisés au sein des autophagosomes (Kabeya *et al*, 2000, 2004; Chakrama *et al*, 2010). Cependant, pour être localisés au niveau des autophagosomes,

ils doivent subir des modifications post-traductionnelles pour être liés à un phospholipide : le PE (**Figure 12**). Ainsi, contrairement au système de conjugaison ATG12–ATG5–ATG16L1, les membres de la famille ATG8 ne se lient pas à une protéine, mais à un lipide. On appelle ce type de liaison une lipidation. Tous les membres de la famille ATG8 sont synthétisés sous la forme immature pro-ATG8, dont l'extrémité C-terminale sera clivée par une protéase ATG4 et ainsi exposer un résidu glycine pour donner la forme ATG8-I mature cytosolique. En effet, les protéines de la sous-famille GABARAP possèdent une glycine C-terminale conservée en position 116 (Tanida *et al*, 2003; Chakrama *et al*, 2010) et en position 120 pour les membres de la sous-famille LC3 (Kabeya *et al*, 2004) (**Figure 10**). La forme ATG8-I est ensuite activée par ATG7 (enzyme E1) puis transférée sur ATG3 (enzyme E2). Pour finir, la conjugaison des protéines de la famille ATG8 au PE sera activée par le complexe ATG12–ATG5–ATG16L1 (enzyme E3), donnant ainsi la forme lipidée et membranaire ATG8-II, liée aux autophagosomes (Tanida *et al*, 2004). C'est la localisation du complexe ATG12–ATG5–ATG16L1 qui détermine le site de la lipidation d'ATG8 mais facilite également cette réaction en permettant le transfert d'ATG8 de la protéine ATG3 vers le PE (Hanada *et al*, 2007). L'association des protéines de la famille ATG8 aux autophagosomes concerne à la fois les membranes interne et externe de l'autophagosome. Cependant, cette association est réversible pour les membres de la famille ATG8 qui se trouvent au niveau de la membrane externe. En effet, ATG4B peut délipider ATG8-II en donnant ainsi la forme ATG8-I, pour permettre son recyclage et permettre ainsi la formation de nouveaux autophagosomes (Kirisako *et al*, 2000) (**Figure 12**). Les formes ATG8-II présentes au niveau de la membrane interne des autophagosomes seront, quant à elles, dégradées après la fusion avec le lysosome.

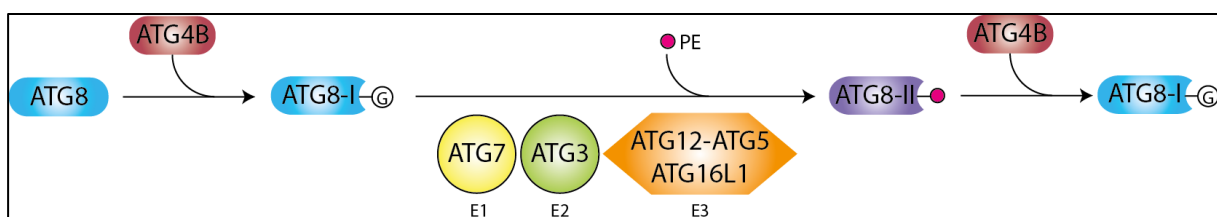


Figure 12 : Système de conjugaison des protéines de la famille ATG8. La conjugaison des protéines de la famille ATG8 au PE est réalisée par une série d'étapes impliquant des protéines ATG. Les protéines ATG8 sont clivées au niveau de leur extrémité C-terminale par ATG4B afin d'exposer leur résidu glycine. Cette forme cytosolique d'ATG8 est appelée ATG8-I. La glycine est ensuite activée par ATG7 (enzyme E1) puis transférée sur ATG3 (enzyme E2). Pour finir, ATG8 est lipidée au PE grâce au complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (enzyme E3) et ainsi donner la forme associée aux autophagosomes ATG8-II. L'association des protéines de la famille ATG8 à la membrane des autophagosomes est réversible et est réalisée par ATG4B.

Parmi toutes les protéines ATG, la famille ATG8 est la seule à être associée aux autophagosomes matures et ses membres servent donc de marqueurs des autophagosomes (Tanida *et al*, 2004). L'existence de plusieurs membres dans la famille ATG8 implique cependant que ces différents homologues pourraient avoir des rôles différents dans la biogénèse des autophagosomes. En effet, alors que les membres de la sous-famille LC3 auraient un rôle dans l'élongation de la membrane autophagosomale, les membres de la sous-famille GABARAP auraient un rôle plus tardif dans la maturation de l'autophagosome, dans une étape couplée à la dissociation du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (Weidberg *et al*, 2010). En effet, il a été montré que GABARAP pouvait recruter la kinase PI4K2A (*phosphatidylinositol 4-kinase type 2 α*) au niveau des autophagosomes afin de réguler la fusion avec les lysosomes (Albanesi *et al*, 2015). De plus, une étude récente a suggéré un rôle préférentiel des protéines de la sous-famille GABARAP par rapport à celles de la sous-famille LC3 dans la fusion membranaire (Engedal & Seglen, 2016).

Le recrutement des membres de la famille ATG8 au niveau des autophagosomes peut également être contrôlé par d'autres modifications post-traductionnelles. En effet, il a été montré que LC3 pouvait être phosphorylée par la PKA (protéine kinase A) et que suite à une induction de l'autophagie dans des cellules neuronales, LC3 est déphosphorylée pour activer son association aux membranes (Cherra *et al*, 2010). De plus, les protéines de la famille ATG8 peuvent être acétylées par l'acétyltransférase p300, ce qui régule de manière négative leur activité (Lee & Finkel, 2009).

En plus de leur rôle dans la biogénèse des autophagosomes, les protéines de la famille ATG8 ont un rôle important dans la reconnaissance et le recrutement spécifique des éléments à dégrader pendant l'autophagie sélective, *via* des interactions avec des récepteurs autophagiques (Birgisdottir *et al*, 2013; Wild *et al*, 2014). En effet, ces récepteurs autophagiques possèdent une région LIR (*LC3-interacting region*) interagissant avec LC3, qui leur permet de se lier aux protéines de la famille ATG8. De nombreux substrats peuvent être reconnus par ces récepteurs, tels que des substrats ubiquitinylés, des agrégats protéiques ou des mitochondries endommagées et permettent de les diriger vers les autophagosomes grâce à leur domaine LIR. Depuis la découverte de la protéine SQSTM1 (séquestosome 1 ou P62), une protéine aux multiples fonctions qui est également un récepteur autophagique pour les agrégats protéiques ubiquitinylés (Pankiv *et al*, 2007), de nombreuses autres protéines ont été identifiées comme récepteurs autophagiques. Par exemple, la protéine NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*) a également été impliquée dans la dégradation d'agrégats protéiques (Kirkin

et al, 2009), la protéine NDP52 (*nuclear dot protein of 52 kDa*) a, quant à elle, été impliquée dans l'autophagie des pathogènes intracellulaires (Thurston *et al*, 2009) alors que NIX est impliquée lors de la dégradation spécifique des mitochondries endommagées, la mitophagie (Schweers *et al*, 2007). Cependant, il a été montré que la liaison de SQSTM1/P62 aux protéines ubiquitinylées peut conduire à la formation d'agrégats protéiques grâce à la capacité de SQSTM1/P62 de se polymériser. L'agrégation permet d'éliminer ces agrégats et ce processus d'autophagie spécifique est contrôlé par la protéine ALFY (*autophagy-linked FYVE protein*). Cette protéine est recrutée par son interaction avec SQSTM1/P62 afin de faciliter la séquestration d'oligomères protéiques dans des agrégats plus larges qui pourront être dégradés par l'autophagie. ALFY permet ainsi le recrutement d'ATG5-ATG12 (par sa liaison avec ATG5) au niveau de l'agrégat protéique et grâce à sa liaison au PI3P dans la membrane autophagique, ALFY facilite la liaison d'ATG16L1 pour permettre la lipodation d'ATG8 dans la membrane (Clausen *et al*, 2010; Filimonenko *et al*, 2010).

2.2.3.3 Biogénèse des lysosomes

Les lysosomes, découverts par Christian De Duve (De Duve *et al*, 1955), sont des organites qui ont un rôle dans la dégradation de macromolécules délivrées par des voies endosomales, de phagocytose ou par autophagie. Les lysosomes sont également impliqués dans de nombreux processus physiologiques, tels que l'homéostasie du cholestérol, la réparation de la membrane plasmique, la défense contre les pathogènes ou encore la mort cellulaire (Saftig & Klumperman, 2009). Le pH au sein du lysosome est acide (pH 4,5-5) et deux classes de protéines sont essentielles pour leur fonction: les hydrolases lysosomales solubles et les protéines de la membrane lysosomale (*lysosomal membrane protein*, LMP). Chacune des 50 hydrolases lysosomales connues à ce jour ciblent des substrats spécifiques pour induire leur dégradation. Chez les mammifères, le lysosome contient environ 25 LMP (Lübke *et al*, 2009) qui permettent l'acidification de la lumière lysosomale grâce aux pompes de type V-ATPases, l'importation de protéines depuis le cytosol, la fusion de membranes ou encore le transport des produits de dégradation vers le cytoplasme (Eskelinen *et al*, 2003). Parmi les LMP les plus abondantes, nous pouvons citer la protéine LAMP1 (*lysosome-associated membrane protein 1*) ou encore LAMP2.

La biogénèse des lysosomes peut être contrôlée par un facteur de transcription « EB » (*Transcription factor EB*, TFEB), qui régule positivement un ensemble de gènes appartenant à un réseau nommé CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*), qui

correspond à des gènes codant des protéines lysosomales ainsi que des protéines membranaires (Sardiello *et al*, 2009). Une surexpression de TFEB peut ainsi réguler le nombre de lysosomes dans la cellule mais TFEB peut également réguler l'autophagie en régulant de manière positive l'expression des gènes de l'autophagie (Settembre *et al*, 2011). En effet, TFEB peut être régulé par phosphorylation par mTORC1 ou encore par la kinase ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*). L'inactivation de mTORC1 et d'ERK2 lors d'une carence en nutriments inhibe la phosphorylation de TFEB et favorise ainsi la translocation de ce facteur de transcription dans le noyau pour activer le réseau CLEAR (Settembre *et al*, 2012; Martina *et al*, 2012; Rocznik-Ferguson *et al*, 2012).

2.2.3.4 Fusion autophagosome/lysosome et dégradation

Une fois la maturation et la fermeture complète de l'autophagosome, celui-ci va fusionner avec le lysosome afin d'induire la dégradation de son contenu. Cependant, l'autophagosome et le lysosome sont des compartiments bien distincts, avec une distribution intracellulaire spécifique. Leur dynamique spatio-temporelle est donc un aspect essentiel au processus de fusion afin de permettre la formation de l'autophagolysosome. En effet, le lysosome est localisé principalement à côté du centre organisateur des microtubules, le centrosome, alors que l'autophagosome est généré dans le cytoplasme (Kawabata & Yoshimori, 2016). L'autophagosome doit donc « se déplacer » dans la cellule pour pouvoir fusionner avec le lysosome. En effet, en réponse à des conditions pauvres en nutriments, le mouvement des autophagosomes augmente de manière significative, et de manière dépendante de LC3A (Kimura *et al*, 2008). Ce mouvement est facilité par la protéine FYCO1 (*FYVE and coiled-coil domain-containing protein*) qui permet de créer un lien entre l'autophagosome *via* son domaine LIR et le lysosome par son interaction avec Rab7 (une Rab GTPase localisée au niveau des endosomes tardifs et lysosomes) de manière dépendante des microtubules (Pankiv *et al*, 2010) (**Figure 13A**).

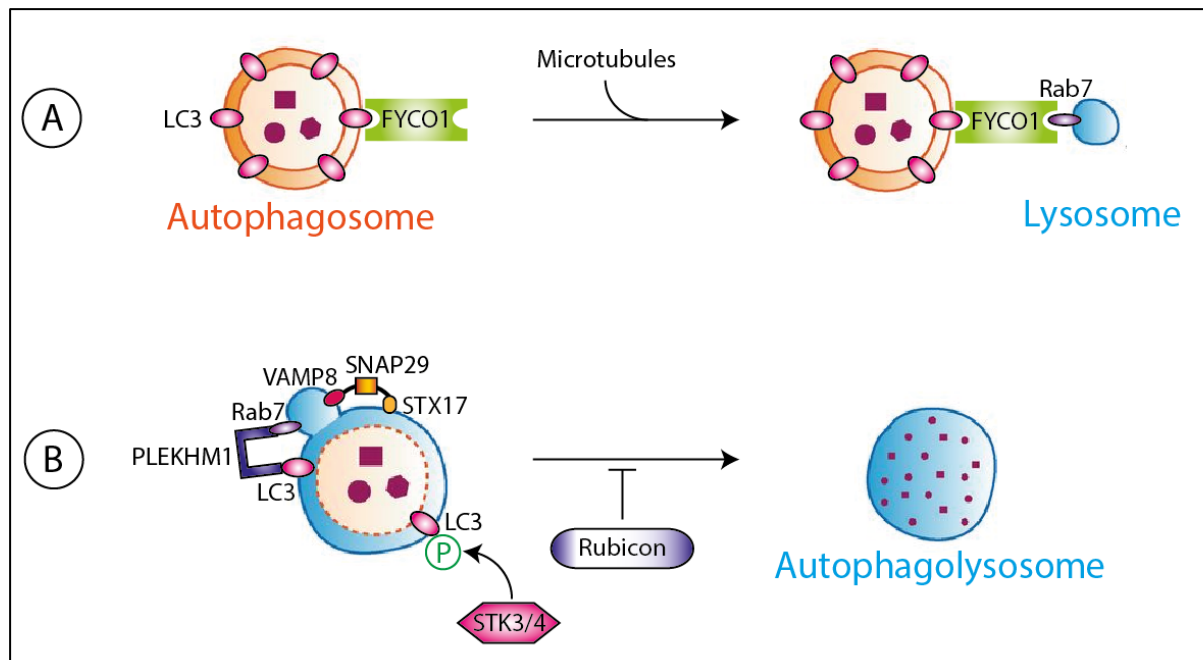


Figure 13 : Mécanismes moléculaires de la fusion autophagosome/lysosome. (A) Le rapprochement de l'autophagosome avec le lysosome est facilité par FYCO1, qui se lie à LC3 situé sur l'autophagosome mais également avec Rab7 localisé sur le lysosome. Ce mouvement est dépendant des microtubules. (B) Plusieurs événements sont nécessaires pour permettre la fusion autophagosome/lysosome : (1) la protéine SNAP29 interagit avec STX17 situé sur la membrane externe de l'autophagosome et avec VAMP8 localisé sur le lysosome ; (2) PLEKHM1 crée un lien entre ATG8 et Rab7 et (3) Les kinases STK3 et STK4 phosphorylent LC3. La formation de l'autophagolysosome est régulée négativement par Rubicon. Modifiée d'après Okamoto, 2014.

Une fois que l'autophagosome et le lysosome se sont rapprochés, ils doivent se connecter l'un à l'autre. La syntaxine 17 (STX17), un récepteur protéique appartenant à la famille SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) et visible uniquement sur la membrane externe des autophagosomes fermés, participe à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Itakura *et al*, 2012). En effet, cette protéine est capable d'interagir avec SNAP29, qui permet de former un lien avec la protéine SNARE lysosomale VAMP8 (Itakura & Mizushima, 2013). Cet événement nécessite l'interaction de STX17 avec le complexe HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*), permettant ainsi la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Jiang *et al*, 2014). De plus, il a été récemment montré que la phosphorylation de LC3B par les kinases Hippo STK3/STK4 permet la fusion autophagosome/lysosome (Wilkinson *et al*, 2015). Il a été également démontré qu'une protéine de liaison au complexe HOPS, PLEKHM1 (*Pleckstrin homology domain containing protein family member 1*), peut s'associer aux membres de la famille ATG8 par son domaine LIR mais aussi avec Rab7, pour permettre la formation de l'autophagolysosome (McEwan *et al*, 2015) (**Figure 13B**).

Comme montré précédemment, la formation de l'autophagolysosome est finement orchestrée mais il existe des mécanismes permettant de limiter ce processus afin de vérifier que les composants inclus dans l'autophagosome sont bien destinés à être dégradés, au regard de la demande énergétique de la cellule mais également pour conserver l'intégrité cellulaire. Pour cela, il existe un régulateur négatif de la formation des autophagolysosomes, la protéine Rubicon (*Run domain beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein*) (**Figure 13B**). En effet, une diminution de l'expression de Rubicon augmente la formation d'autophagolysosomes et la dégradation de substrats de l'autophagie (Matsunaga *et al*, 2009; Zhong *et al*, 2009; Sun *et al*, 2011). Rubicon est contrôlé par de multiples mécanismes de régulation, tels que sa liaison avec la protéine UVRAG. En effet, lors de conditions riches en nutriments, mTORC1 phosphoryle UVRAG qui peut ainsi se lier à Rubicon. Lors d'une carence en nutriments, UVRAG est déphosphorylée et peut ainsi se lier au complexe HOPS, favorisant ainsi la maturation de l'autophagosome (Kim *et al*, 2015). Rubicon peut également être contrôlée par BECLIN1 acétylée (Sun *et al*, 2015) ou encore la voie des récepteurs au facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth factor Receptor*, EGFR) (Tan *et al*, 2015). Il faut cependant noter que Rubicon ne contrôle pas uniquement la formation des autophagolysosomes mais régule également négativement la maturation des endosomes (Sun *et al*, 2010) et positivement la phagocytose associée à LC3 (*LC3-associated phagocytosis*, LAP) dans les macrophages (Martinez *et al*, 2015).

Afin de digérer le contenu de l'autophagosome, le pH au sein de l'autophagolysosome doit être maintenu, afin que les hydrolases lysosomales puissent avoir une activité optimale. En effet, les pompes V-ATPases issues de la membrane lysosomale permettent l'acidification de l'autophagolysosome formé (Yamamoto *et al*, 1998). Ainsi, l'action des hydrolases lysosomales va permettre la dégradation totale du contenu mais également de la membrane interne de l'autophagosome initial. Cet autophagolysosome pourra ensuite être utilisé pour former un nouveau lysosome (Kawabata & Yoshimori, 2016).

2.3 La protéine autophagique ATG9A

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'expression d'*ATG9A* dans les cancers du sein ainsi qu'à son rôle dans des modèles cellulaires de cancer du sein triple négatif. Comme cité précédemment en «2.2.2.3», *ATG9A* joue un rôle important dans l'étape d'initiation de l'autophagie mais également dans différents types d'autophagie sélective, mais surtout, elle est la seule protéine autophagique transmembranaire connue à ce jour et joue un

rôle dans l'étape d'initiation de l'autophagie mais également dans différents types d'autophagie sélective, qui seront décrits dans la suite de ce manuscrit. La protéine Atg9 chez la levure possède deux homologues chez le mammifère : ATG9A et ATG9B (**Figure 14A**).

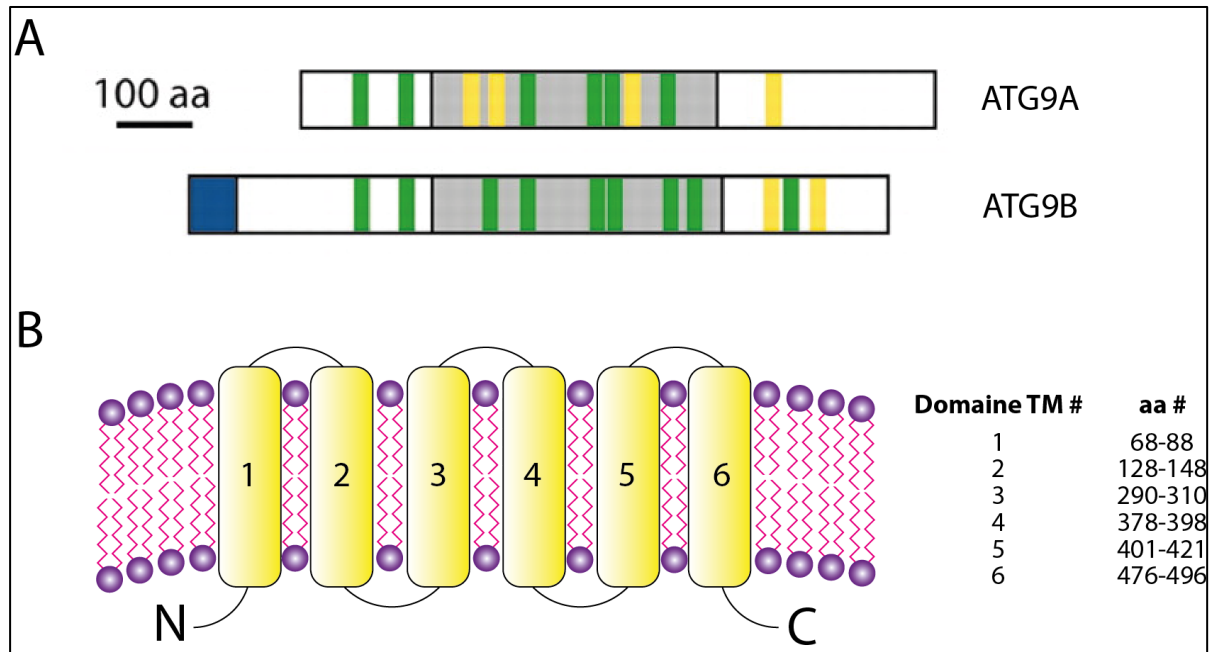


Figure 14 : ATG9A et ATG9B chez l'homme. (A) Comparaison des séquences protéiques humaines d'ATG9A et ATG9B, qui codent respectivement des protéines de 839 et 924 acides aminés. Le domaine hautement conservé entre ces homologues est montré en gris. Les domaines transmembranaires démontrés (vert) et probables (jaune) ainsi qu'une séquence signal mitochondriale probable (bleu) sont montrés également. Modifiée d'après Yamada et al. 2005. **(B)** Insertion membranaire de la protéine ATG9A humaine. Les deux extrémités N- et C-terminales se situent du côté cytosolique. Les acides aminés des domaines transmembranaires 1 à 6 sont présentés à droite du schéma.

Les deux gènes codant ces protéines ne sont pas situés sur le même chromosome. En effet, *ATG9A* se situe sur le chromosome 2 (2q35) alors qu'*ATG9B* est localisé sur le chromosome 7 (7q36) (Robb *et al*, 2004). *ATG9A* est exprimée de manière ubiquitaire alors qu'*ATG9B* a une expression limitée au niveau du placenta et de la glande pituitaire (Yamada *et al*, 2005). *ATG9B* joue un rôle similaire à *ATG9A* dans le processus autophagique mais elle semble néanmoins avoir un rôle spécifique dans le développement des mammifères, du fait de la restriction de son expression. Les données décrites ci-après concerneront seulement la protéine *ATG9A* car très peu de données sont disponibles à ce jour sur le rôle d'*ATG9B*.

ATG9A possède 6 domaines transmembranaires conservés et ses deux extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques (Young *et al*, 2006) (**Figure 14B**). Cette protéine joue un rôle important dans l'autophagie car il a été montré que des souris déficientes pour *ATG9A* ne survivent pas à la phase de carence de la période néonatale (Saitoh *et al*, 2009), au cours de laquelle le processus autophagique est essentiel à la survie (Kuma *et al*, 2004). De plus, des

fibroblastes murins présentant une déficience pour ATG9A sont incapables d'induire l'autophagie en conditions de carence en nutriments, provoquant ainsi une accumulation de protéines à longue durée de vie ainsi que de la protéine substrat de l'autophagie, SQSTM1/P62 (Saitoh *et al*, 2009). Cependant, quelques autophagosomes peuvent être formés dans des cellules embryonnaires de souris (MEF) ou humaines (HEK293) déficientes pour ATG9A, suggérant que cette protéine ne serait pas cruciale dans des conditions d'autophagie basale, mais que son rôle serait plus important lorsque l'autophagie est induite (Saitoh *et al*, 2009; Orsi *et al*, 2012). De plus, la déplétion d'ATG9A conduit à une diminution du nombre de phagophores dans les cellules HEK293 (Orsi *et al*, 2012), ce qui confirme son rôle important lors des étapes très précoces de la formation des autophagosomes.

Par ailleurs, ATG9A semble importante pour différents types d'autophagie sélective. ATG9A permet, par exemple, le recrutement du complexe PI3KC3 lors de la réponse à l'invasion intracellulaire par *Salmonella*, ce qui conduit à l'augmentation de l'autophagie et à l'inhibition de la prolifération de cette bactérie (Kageyama *et al*, 2011). La protéine ATG9A joue également un rôle dans un autre type d'autophagie sélective : la mitophagie. En effet, des vésicules contenant ATG9A sont recrutées au niveau des mitochondries endommagées lors des étapes précoces de la mitophagie, juste après l'ubiquitinylation de la membrane externe des mitochondries par la protéine PARKIN. Le recrutement d'ATG9A au niveau des mitochondries est indépendant du recrutement du complexe ULK1. Cependant, ATG9A et le complexe ULK1 doivent être présents sur la mitochondrie pour que les autres effecteurs de l'autophagie soient recrutés, afin de permettre la dégradation de la mitochondrie ciblée (Itakura *et al*, 2012). De plus, l'activation de la mitophagie par PARKIN induit la relocalisation de TFEB dans le noyau afin de réguler la biogénèse des lysosomes. Cette relocalisation de TFEB nécessite les protéines ATG9A et ATG5 (Nezich *et al*, 2015).

2.4 La protéine Atg9 chez la levure

A ce jour, la plupart des données concernant le rôle d'Atg9 dans le processus autophagique proviennent d'études faites chez la levure. Dans cet organisme, Atg9 est nécessaire à la formation des autophagosomes (Noda *et al*, 2000) et son taux intracellulaire est directement corrélé au nombre d'autophagosomes produits (Jin *et al*, 2014).

Cette protéine peut être retrouvée à la fois dans des structures cytoplasmiques dispersées appelées réservoirs d'Atg9, comme dans des structures pré-autophagosomales ou

au niveau du site d'assemblage du phagophore (*phagophore assembly site*, PAS) (Reggiori *et al.*, 2004, 2005). Atg9 est produite au niveau du Golgi et son adressage au niveau des réservoirs est dépendante d'Atg23 et Atg27 (Yamamoto *et al.*, 2012) mais, à ce jour, il n'existe pas d'homologues de ces deux protéines chez les mammifères.

Lors de l'induction de l'autophagie, Atg9 se localise au niveau du PAS grâce à son interaction avec Atg17, un membre du complexe Atg1(ULK1)-Atg13, homologue du complexe ULK1 chez les mammifères (Sekito *et al.*, 2009). En conditions de carence, des vésicules d'Atg9 provenant des réservoirs, s'assemblent au niveau du PAS et fournissent ainsi une source membranaire pour débiter la formation d'un autophagosome (Yamamoto *et al.*, 2012).

La recyclage d'Atg9 au niveau du PAS est dépendante du complexe Atg1-Atg13 puisque la délétion de l'une ou l'autre de ces protéines conduit à une accumulation d'Atg9 dans le PAS (Reggiori *et al.*, 2004). Ce recyclage d'Atg9 situé au niveau du PAS nécessite également Atg2, Atg18 (homologue des protéines WIPI chez les mammifères) et le complexe PI3K qui permet de recruter le complexe Atg2-Atg18. Atg9 est capable d'interagir avec Atg2 et Atg18 et cette interaction permet le recrutement d'Atg2 à la membrane (Wang *et al.*, 2001, 2). Des cellules déficientes pour Atg9 ne peuvent recruter le complexe Atg2-Atg18 au niveau du PAS, suggérant qu'Atg9 joue un rôle dans le recrutement des protéines nécessaires à son propre recyclage (Suzuki *et al.*, 2007).

2.5 La protéine ATG9A chez les mammifères

La localisation ainsi que les déplacements intracellulaires d'ATG9A sont moins bien connus. Dans des conditions basales, ATG9A se localise principalement au niveau du trans-Golgi et dans les endosomes de recyclage qui correspondent aux réservoirs observés chez la levure (Young *et al.*, 2006; Orsi *et al.*, 2012). ATG9A peut se déplacer entre ces deux compartiments *via* le système de transport des vésicules.

En effet, le transport d'ATG9A des endosomes de recyclage vers l'appareil de Golgi est régulé par l'interaction de la Rab GTPase TBC1D14 et du complexe TRAPIII. Ce trafic d'ATG9A vers le Golgi en conditions basales mais également en conditions de carence permet de fournir une quantité suffisante de vésicules contenant ATG9A pour permettre la formation d'autophagosomes (Longatti *et al.* 2012; Lamb *et al.* 2015). Le complexe « rétromère », qui permet le recyclage de protéines membranaires des endosomes vers le *trans-golgi* (pour une revue, voir Trousdale & Kim, 2015) est également impliqué dans le

transport d'ATG9A pour permettre la formation d'autophagosomes (Zavodszky *et al*, 2014) (**Figure 15A**).

Lors de l'induction de l'autophagie, une partie des protéines ATG9A est redistribuée au niveau du site de formation de l'autophagosome (Young *et al*, 2006; Orsi *et al*, 2012; Popovic & Dikic, 2014). Cependant, ces vésicules contenant ATG9A interagissent de manière dynamique avec les phagophores et les autophagosomes sans être intégrées à leur membrane (Orsi *et al*, 2012). Le transport d'ATG9A vers le site de formation des autophagosomes est très important pour l'induction de l'autophagie et est régulé par des voies de transport membranaire. En effet, le transport d'ATG9A vers le site de formation des autophagosomes peut être régulé par son interaction avec le complexe AP-2 (Imai *et al*, 2016), qui permet d'adresser les protéines transmembranaires dans des vésicules associées à la clathrine. Lors de l'induction de l'autophagie, les vésicules contenant ATG9A et AP-2 sont redistribuées au niveau du site de formation des autophagosomes par le biais de TBC1D5 qui se lie à la fois à AP-2 et à LC3 (Popovic & Dikic, 2014) (**Figure 15B**).

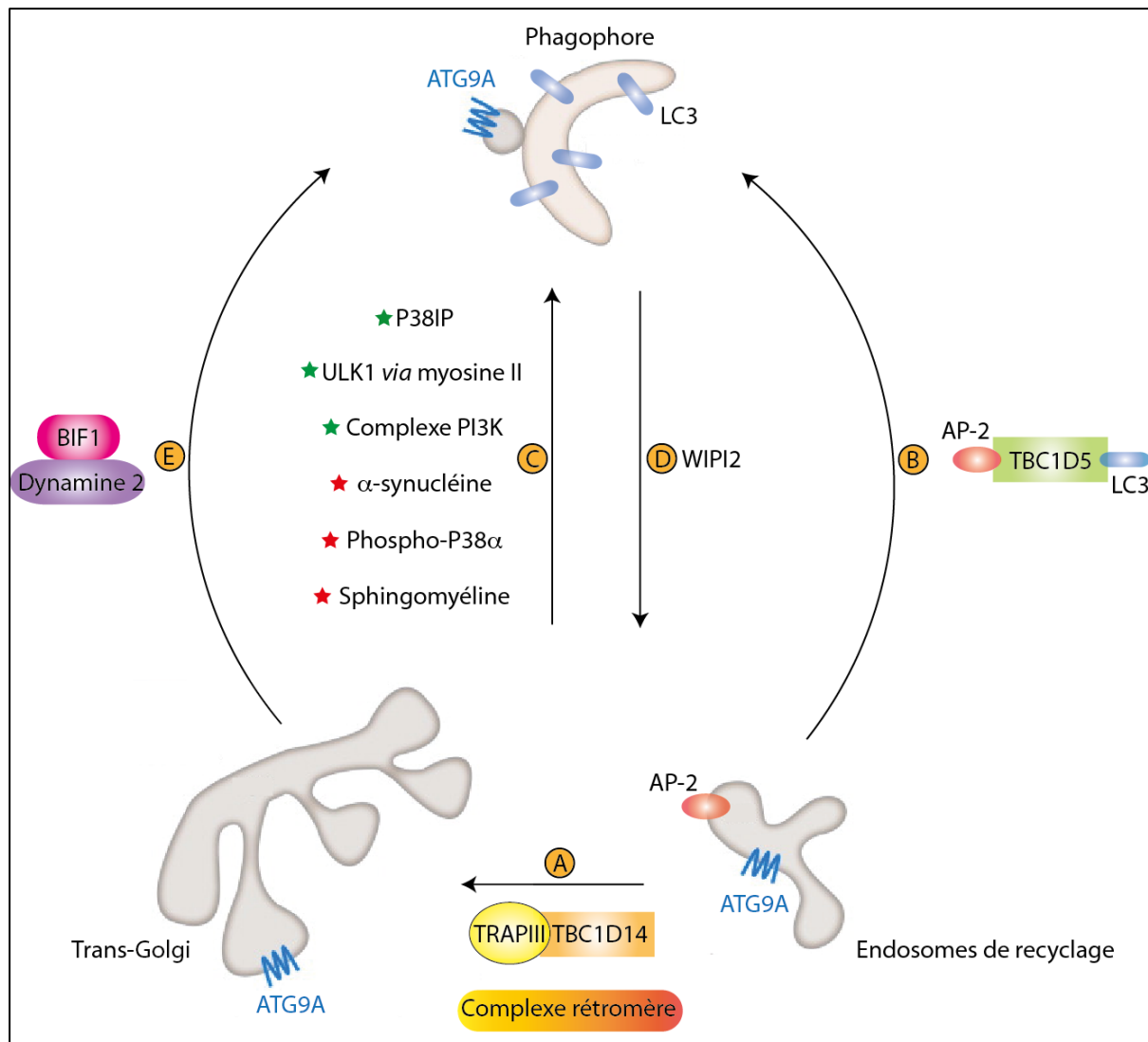


Figure 15 : Régulation de la localisation intracellulaire d'ATG9A. (A) ATG9A localisée dans les endosomes de recyclage peut être renvoyée dans le *trans*-golgi par le biais du complexe TRAPIII et de sa liaison à TBC1D14 mais également par le complexe rétomère. (B) ATG9A présent dans les endosomes de recyclage contenant le complexe AP-2 peut être envoyé vers le site d'initiation de l'autophagie grâce à TBC1D15. En effet, cette protéine forme un lien entre les endosomes de recyclage et les autophagosomes par son interaction avec AP-2 et LC3. (C) Le transport d'ATG9A vers le site d'initiation de l'autophagie est régulé positivement par P38IP, le complexe ULK1 *via* la myosine II ainsi que le complexe PI3K. L' α -synucléine, la sphingomyéline ainsi que la forme phosphorylée de P38 α sont des régulateurs négatifs du transport d'ATG9A lors de l'induction de l'autophagie. (D) WIPI2 permet le recyclage d'ATG9A présent sur le site d'initiation de l'autophagie, afin de permettre la poursuite du processus autophagique. (E) Le transport d'ATG9A du *trans*-Golgi vers le phagophore est régulé par le complexe BIF1-Dynamine 2. Modifiée d'après Zavodsky et al. 2013.

2.6 Régulation de la localisation d'ATG9A

La localisation d'ATG9A étant dépendante de son rôle dans l'induction de l'autophagie, son transport est très régulé. ULK1 a été la première protéine identifiée comme étant capable d'influencer le transport d'ATG9A. En effet, lorsque l'expression d'ULK1 est inhibée par siARN dans les cellules HEK293, ATG9A ne peut être redistribuée en réponse à une carence en nutriments et reste séquestrée dans l'appareil de Golgi (Young *et al*, 2006). Des résultats

similaires ont été obtenus lorsqu'un autre membre du complexe ULK1, ATG13, est éteint (Chan *et al.*, 2009).

Une étude a suggéré qu'ULK1 modifiait la localisation d'ATG9A *via* une cascade de réactions impliquant la myosine II (Tang *et al.*, 2011). En effet, ULK1 peut phosphoryler ZIPK (*zipper-interacting protein kinase*) qui va phosphoryler à son tour MRLC (*myosin regulatory light chain*). L'activité de la myosine II est dépendante du statut de phosphorylation de MRLC et son activation est nécessaire à l'induction de l'autophagie et à la relocalisation d'ATG9A. En conditions de carence en nutriments, ATG9A interagit avec une chaîne lourde de la myosine II et l'élimination de ZIPK ou d'ULK1 casse cette interaction, empêchant ainsi la relocalisation d'ATG9A. Ces données suggèrent que la voie ULK1-ZIPK-myosine II est importante dans la relocalisation d'ATG9A, et le rôle de la myosine II pourrait être celui d'un moteur protéique impliqué dans le mouvement d'ATG9A lors de l'induction de l'autophagie (**Figure 15C**).

Le complexe PI3K est également important dans la relocalisation d'ATG9A puisque des inhibiteurs de PI3K empêchent son transport lors d'une carence en nutriments dans les cellules Hela et HEK293 (Young *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2011). L'utilisation d'inhibiteurs d'autres membres du complexe PI3K, comme BECLIN1 et UVRAG, a un effet similaire (Takahashi *et al.*, 2011) (**Figure 15C**). Une étude a également montré qu'ATG9A est nécessaire au recrutement du complexe PI3K lors de la xénophagie spécifique de *Salmonella typhimurium* (Kageyama *et al.*, 2011). Cependant, nous ne savons pas à ce jour si ce mécanisme est également applicable à la macroautophagie.

Comme cité précédemment, la relocalisation d'ATG9A au niveau du site de formation des autophagosomes est nécessaire à l'induction de l'autophagie, mais cette interaction avec les phagophores reste dynamique et transitoire (Orsi *et al.*, 2012) et la protéine WIPI2 permettrait le recyclage d'ATG9A vers les endosomes de recyclage (**Figure 15D**). En effet, lorsque cette protéine est absente dans la cellule, ATG9A s'accumule au niveau du phagophore qui est incapable de devenir un autophagosome (Orsi *et al.*, 2012).

La localisation d'ATG9A est également régulée par BIF1, une protéine impliquée dans le réarrangement des membranes, en induisant par courbure la formation des tubules étroits qui deviendront ensuite des vésicules par fission des tubules (Farsad *et al.*, 2001). BIF1 a été initialement associée à la régulation de la formation des autophagosomes *via* son interaction avec le complexe PI3K et son association aux membranes de différents organites, telles que celles de l'appareil de Golgi et des mitochondries (Takahashi *et al.*, 2011). Lors d'une carence en nutriments, BIF1 permet la relocalisation d'ATG9A au niveau du site de formation des

autophagosomes. En effet, en l'absence de cette protéine et lors d'une carence en nutriments, les membranes de l'appareil de Golgi contenant ATG9A ne présentent pas de tubulation ni de fission et la lipidation de LC3 est inhibée. Cette même équipe a récemment montré que ce phénomène est dépendant de l'interaction de BIF1 avec la dynamine 2. En effet, lors d'une carence en nutriments, l'interaction entre ces 2 protéines est augmentée pour permettre la synthèse de vésicules contenant ATG9A à partir de l'appareil de Golgi (Takahashi *et al*, 2016) (**Figure 15E**).

Une approche par double-hybride chez la levure a permis d'identifier P38IP comme partenaire influençant la localisation d'ATG9A (Webber & Tooze, 2010). En effet, l'interaction d'ATG9A avec P38IP permet l'induction de l'autophagie. Cette interaction est régulée négativement par la P38 α MAPK qui est activée par phosphorylation en conditions riches en nutriments. P38 α MAPK active peut ainsi se lier à P38IP et empêcher donc la liaison de P38IP avec ATG9A pour limiter la relocalisation d'ATG9A et l'activation de l'autophagie (**Figure 15C**).

Le trafic intracellulaire d'ATG9A est important dans sa fonction et la dérégulation de son transport a notamment été associée aux maladies de Parkinson et de Niemann-Pick. En effet, dans la maladie de Parkinson, l' α -synucléine s'accumule dans le cytoplasme des neurones. La surexpression de cette protéine dans des cellules *in vitro* ou *in vivo* conduit à une dérégulation de la localisation d'ATG9A associée à un déficit dans le processus autophagique. Les auteurs montrent que ce processus serait dépendant de l'inactivation de RAB1A par l' α -synucléine (Winslow *et al*, 2010). L'accumulation de sphingomyéline dans la maladie de Niemann-Pick est également associée à un flux autophagique réduit. En effet, la sphingomyéline empêcherait la relocalisation d'ATG9A au niveau du site de formation des autophagosomes (Corcelle-Termeau *et al*, 2016) (**Figure 15C**).

A ce jour, seuls quelques éléments de la voie de régulation d'ATG9A sont connus et des études plus approfondies seront encore nécessaires pour mieux comprendre comment cette voie est régulée et comment toutes ces protéines régulatrices interagissent entre-elles. Néanmoins, il est clair que la localisation d'ATG9A est importante pour l'induction de la formation des autophagosomes, particulièrement lorsque l'autophagie est induite. ATG9A est une protéine qui joue un rôle dans les étapes précoces de la formation des phagophores et pourrait agir juste avant, après ou en même temps que le recrutement du complexe PI3K.

Cette protéine a donc un rôle dans l'étape d'initiation de l'autophagie mais également dans la distribution des lipides lors de la croissance des phagophores (Orsi *et al*, 2012).

3. Autophagie et cancers

L'autophagie joue un rôle dans de nombreux processus biologiques et sa dérégulation est souvent associée à des pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Hara *et al*, 2006; Komatsu *et al*, 2006), les maladies cardiaques (pour une revue, voir Gottlieb & Mentzer, 2010), le diabète de type II (Jung *et al*, 2008), ou encore les maladies infectieuses (Birmingham *et al*, 2006; Orvedahl *et al*, 2010). La plupart de ces maladies sont caractérisées par une accumulation de protéines mutées ou mal repliées et à un processus autophagique altéré, ne permettant pas l'élimination de ces protéines. C'est le cas des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Lee *et al*, 2010) ou la maladie de Huntington (Martinez-Vicente *et al*, 2010), qui sont associées à une altération de l'élimination de substrats alors que certaines maladies cardiaques sont associées à une déficience de l'élimination des autophagosomes par les lysosomes (Zhao *et al*, 2012). L'autophagie joue également un rôle dans les cancers. Cependant, ce rôle est complexe car en fonction du contexte, l'autophagie peut avoir un rôle pro- ou anti-tumoral (**Figure 16**).

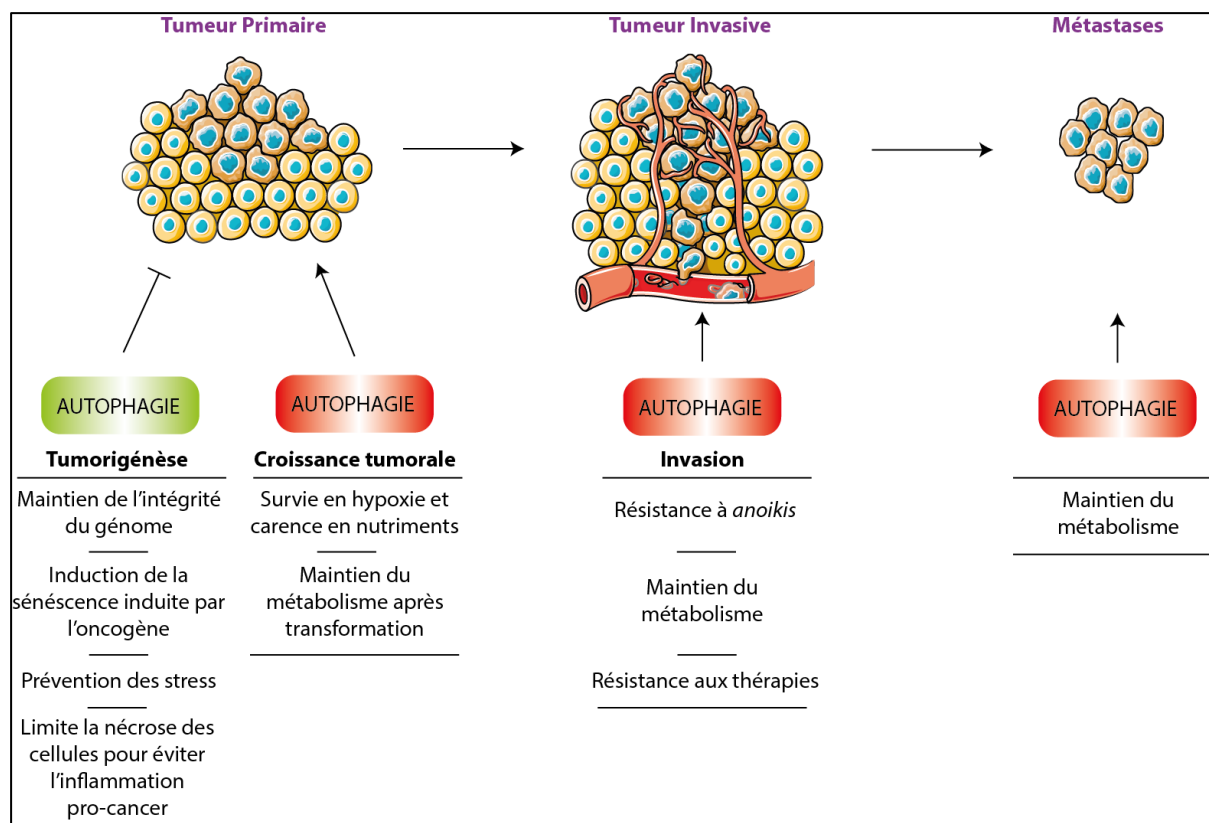


Figure 16 : Rôles pro- et anti-tumoraux de l'autophagie. Alors que l'autophagie semble avoir un rôle suppresseur de tumeur lors de la tumorigénèse, l'autophagie est un processus utilisé par les cellules cancéreuses pour survivre aux différentes conditions de stress auxquelles elles devront faire face au cours de la croissance tumorale, de l'invasion ou encore de la formation de métastases.

3.1 Autophagie et rôle suppresseur de tumeur

3.1.1 Le rôle suppresseur de tumeur des protéines ATG

L'autophagie a été initialement décrite comme étant un mécanisme suppresseur de tumeur. En effet, des études ont montré une perte monoallélique du gène *BECLIN1* dans 40 à 75 % des cancers de la prostate, des ovaires ou du sein (Saito *et al*, 1993; Gao *et al*, 1995). De plus, des études cliniques ont montré qu'une expression aberrante de *BECLIN1* (augmentée ou diminuée) dans les tissus tumoraux est associée à un faible pronostic et à un phénotype tumoral agressif (Koukourakis *et al*, 2010; Giatromanolaki *et al*, 2011) et que des souris présentant une délétion monoallélique de *BECLIN1* développent des tumeurs spontanées plus fréquentes, telles que des tumeurs du foie ou du sein (Qu *et al*, 2003; Yue *et al*, 2003). De plus, des délétions d'un ou plusieurs allèles de *BECLIN1* sont fréquemment observées dans des lignées de cancer du sein (Aita *et al*, 1999). Lorsque *BECLIN1* est surexprimée dans la lignée de cancer du sein MCF-7 (luminal A), ceci favorise l'autophagie tout en réduisant le potentiel tumorigénique de cette lignée *in vivo* (Liang *et al*, 1999).

Alors qu'une délétion complète de *BECLIN1* est létale lors du développement embryonnaire, des souris présentant une délétion d'autres gènes ATG, telles qu'*ATG5* ou *ATG7*, survivent jusqu'à 1 à 2 jours après la naissance, mais succombent de déficiences métaboliques ultérieurement (Kuma *et al*, 2004; Komatsu *et al*, 2005). Cette différence de phénotype semble donc indiquer que *BECLIN1* pourrait avoir d'autres fonctions en dehors de l'autophagie et que son rôle suppresseur de tumeur ne serait pas uniquement dû à ses fonctions dans l'activation du complexe PI3KC3 et la biogénèse des autophagosomes. Des études plus récentes montrent que l'autophagie aurait plutôt un rôle suppresseur de tumeurs spontanées. En effet, des modèles de souris présentant une délétion monoallélique d'*ATG5* et des souris présentant une délétion d'*ATG7* ciblée dans le foie, montrent l'apparition spontanée de tumeurs bénignes dans le foie, non invasives et ne formant pas de métastases (Takamura *et al*, 2011; Inami *et al*, 2011). Chez l'homme, moins de 10 % des tumeurs bénignes du foie deviennent malignes et le rôle exact de l'autophagie dans ce processus est encore inconnu (pour une revue, voir Shanbhogue *et al*, 2011). Cependant, ces lésions bénignes sont totalement déficientes pour l'autophagie, supportant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'autophagie serait nécessaire pour permettre la progression tumorale.

3.1.2 Mécanismes anti-tumoraux de l'autophagie

Comme décrit dans le paragraphe précédent, il a été montré que différentes protéines jouant un rôle dans l'autophagie peuvent avoir un rôle suppresseur de tumeurs. Les principaux mécanismes liés à cette fonction seront décrits dans les paragraphes suivants.

3.1.2.1 Maintien de l'intégrité du génome et prévention des stress

Les tumeurs subissent différents stress métaboliques induits par l'hypoxie et le manque de nutriments, qui sont couplés à une demande en énergie croissante, due au phénotype de prolifération important des cellules cancéreuses. Ces stress augmentent donc la possibilité de dommages au sein de la cellule cancéreuse. L'apoptose agit comme première ligne de défense pour éliminer les cellules endommagées. Cependant, lorsque le mécanisme apoptotique est défaillant ou inactivé, ce qui est régulièrement le cas lors de la tumorigenèse, les cellules utilisent l'autophagie pour produire un taux suffisant d'ATP et maintenir l'intégrité cellulaire. En effet, des cellules épithéliales mammaires immortalisées qui présentent une perte monoallélique de *BECLIN1* sont significativement moins résistantes à la mort cellulaire induite par un stress métabolique (Karantza-Wadsworth *et al*, 2007). De manière paradoxale, les cellules *BECLIN1*^{+/+} pouvant utiliser l'autophagie lors de stress pour survivre, sont moins

tumorigènes que les cellules *BECLIN*^{+/-}. Ceci est principalement dû au fait que dans les cellules déficientes en autophagie, le stress métabolique induit de manière significative plus de cassures de l'ADN, une amplification génique ainsi que l'accumulation de mitochondries endommagées, comparé aux cellules sauvages (*wild-type*, WT). De plus, SQSTM1/P62 forme un lien très étroit entre autophagie et tumorigénèse (Mathew *et al*, 2009). En effet, l'accumulation de mitochondries endommagées ainsi que d'agrégats protéiques dans les cellules déficientes en autophagie provoque une augmentation des ROS conduisant à une augmentation des dommages à l'ADN mais également une accumulation de SQSTM1/P62. Cette accumulation de SQSTM1/P62 lors d'un stress métabolique provoque la synthèse de ROS, induisant alors un rétrocontrôle positif. L'autophagie a donc un rôle suppresseur de tumeur en maintenant un taux de ROS intracellulaire peu élevé. Pour finir, une étude a montré qu'une perte de *BECLINI* est associée de manière significative à l'amplification d'*HER2* dans une petite cohorte de patientes atteintes de cancer du sein. Les auteurs ont également associé la perte de *BECLINI* avec des mutations d'autres gènes suppresseurs de tumeurs, comme *P53* et *PTEN*, ceci corroborant l'hypothèse selon laquelle une perte de *BECLINI* et de l'autophagie facilite les dommages à l'ADN et l'instabilité génomique chez les patientes atteintes de cancer du sein *HER2*⁺ (Negri *et al*, 2010). Une étude récente a confirmé ces données dans une cohorte atteignant plus de 3000 patientes et a montré qu'une faible expression de *BECLINI* est retrouvée généralement chez les patientes de type *HER2*⁺ mais également chez les patientes TN et que cette baisse d'expression est associée à des mutations de *P53* (Tang *et al*, 2015).

3.1.2.2 Induction de la sénescence par l'oncogène

La sénescence induite par l'oncogène (*oncogene-induced senescence*, OIS) est un mécanisme permettant un arrêt permanent du cycle cellulaire, en réponse notamment au stress métabolique généré lors de la transformation oncogénique. Lors de la tumorigénèse, ce processus est inhibé par des gènes suppresseurs de tumeur pour permettre la transformation et la prolifération cellulaire. L'autophagie est induite pendant l'OIS, et l'inhibition de ce processus par une extinction des gènes *ATG5* ou *ATG7* permet d'éviter la sénescence (Young *et al*, 2009). En effet, l'autophagie permet le recyclage de constituants cellulaires et favorise ainsi l'OIS en produisant les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines de sécrétion. Il semble donc qu'un taux basal d'autophagie permet d'inhiber la prolifération des cellules pendant l'OIS pour ainsi éviter la progression tumorale.

3.1.2.3 Inhibition de la nécrose pour les cellules résistantes à l'apoptose

La mort cellulaire par nécrose induit l'infiltration de cellules immunitaires, telles que les macrophages, et la production de cytokines pro-inflammatoires qui facilitent la croissance tumorale (pour une revue, voir Vakkila & Lotze, 2004). En effet, les cellules inflammatoires infiltrent la tumeur en réponse aux signaux nécrotiques émis. L'inflammation chronique tumorale associée à une hypoxie sévère au cœur de la tumeur et à un stress métabolique favorise généralement l'immunité pro-tumorale (pour une revue, voir DeNardo *et al*, 2008). En effet, l'infiltration de cellules inflammatoires pro-tumorales, comme les macrophages, est associée à un faible pronostic, soulignant l'importance de comprendre les mécanismes biologiques qu'utilisent les cellules tumorales pour favoriser une réponse immunitaire leur permettant de proliférer (Bingle *et al*, 2002). L'autophagie peut donc limiter la nécrose de cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose, pendant le stress métabolique et inhiber la croissance tumorale en prévenant l'infiltration de leucocytes au niveau du site tumoral initial (Degenhardt *et al*, 2006).

3.2 Le rôle pro-tumoral de l'autophagie

Alors qu'une baisse de flux autophagique semble promouvoir le développement tumoral, ce mécanisme semble être nécessaire pour la survie et le maintien de l'intégrité des cellules cancéreuses. De plus, l'autophagie est induite dans des cellules transformées lorsqu'elles sont exposées à différents stress et procure aux cellules cancéreuses un avantage pour affronter ces stress, que cela soit au niveau du site primaire tumoral ou lors de la progression métastatique. Les principaux mécanismes pro-tumoraux de l'autophagie seront décrits dans les paragraphes suivants.

3.2.1 L'hypoxie

L'hypoxie tumorale résulte d'un manque de vascularisation au sein de la tumeur, qui est associée à un phénotype plus agressif, une plus grande prédisposition à former des métastases et donc à un faible pronostic. L'autophagie est induite en conditions hypoxiques en particulier dans les cellules se localisant au cœur de la tumeur et leur permet de survivre (Degenhardt *et al*, 2006). L'hypoxie active le facteur de transcription HIF1, qui permet de réguler l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'invasion, la résistance aux thérapies (pour une revue, voir Bertout *et al*, 2008), mais permet également, comme décrit précédemment en «2.2.2.1.2», de réguler positivement l'autophagie en induisant l'expression

des gènes *BNIP3* et *NIX* (Zhang *et al*, 2008; Bellot *et al*, 2009). Les mécanismes par lesquels l'autophagie permet la survie des cellules tumorales en conditions hypoxiques restent cependant indéterminés. Il semblerait que la fonction de recyclage de l'autophagie pourrait permettre aux cellules tumorales stressées de faire face à la demande accrue en nutriments (pour une revue, voir Rabinowitz & White, 2010).

3.2.2 Détachement de la matrice extracellulaire

Le détachement des cellules épithéliales de la matrice extracellulaire induit leur mort par une forme d'apoptose, nommée *anoïkis* (Frisch & Francis, 1994). Le processus autophagique est induit dans les cellules immortalisées ou transformées par un oncogène, suite à leur détachement de la matrice, pour se protéger de l'*anoïkis* (Fung *et al*, 2008; Lock *et al*, 2011). A ce jour, les mécanismes par lesquels l'autophagie favorise la survie des cellules après leur détachement ne sont pas encore connus, mais il semble que son rôle protecteur de stress oxydant ainsi que sa capacité à synthétiser de l'énergie pourraient contribuer à la survie des cellules cancéreuses après leur détachement.

Des cultures 3D de cellules mammaires ont montré que l'autophagie est induite dans les cellules détachées et que son inhibition permet de promouvoir la mort de ces cellules (Karantza-Wadsworth *et al*, 2007; Fung *et al*, 2008). De plus, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules de cancer du foie empêche l'apparition de métastases pulmonaires, de manière dépendante de l'*anoïkis* (Peng *et al*, 2013). Ces études montrent que l'autophagie peut permettre aux cellules cancéreuses de résister à l'*anoïkis*, ceci dans le but de survivre suite à leur détachement de la matrice, mais également lors de leur migration jusqu'au site métastatique éloigné (pour une revue, voir Kenific *et al*, 2010).

3.2.3 Transformation oncogénique

Lors de la transformation oncogénique, il est nécessaire que les cellules en cours de transformation présentent un taux basal d'autophagie, afin de répondre à l'augmentation de la demande en énergie. En effet, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules mammaires transformées par l'oncogène *RAS* (les formes mutées de *RAS* constitutivement actives H-*RAS* ou K-*RAS*) diminue la croissance indépendante de l'ancrage des cellules tumorales (Lock *et al*, 2011). De plus, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules épithéliales mammaires exprimant K-*RAS* conduit à une diminution de la capacité de ces cellules à former des colonies sur agar mou, mais également la croissance tumorale *in vivo* (Kim *et al*, 2011). De manière intéressante, l'autophagie a très peu d'effet sur la prolifération de cellules non

transformées (Lock *et al*, 2011). La transformation oncogénique par RAS favorise la production d'énergie et la biosynthèse de macromolécules afin de permettre une prolifération rapide et l'autophagie est un moyen de maintenir ces voies métaboliques. En effet, l'autophagie permet d'augmenter le métabolisme du glucose en facilitant la capture du glucose et le flux glycolytique (Lock *et al*, 2011). D'autres études montrent que l'inhibition de l'autophagie pendant la transformation par RAS est associée à une diminution de la consommation d'oxygène et une diminution du taux de certains intermédiaires du cycle de Krebs (Guo *et al*, 2011; Yang *et al*, 2011). Ces travaux montrent que l'autophagie permet aux cellules tumorales transformées par RAS de proliférer rapidement grâce, en partie, à l'augmentation de leurs capacités métaboliques. Cependant, des mutations de RAS ne sont pas présentes dans tous les cancers du sein. En effet, d'autres voies oncogéniques peuvent être activées, telles qu'HER2 ou PI3K, qui altèrent les voies métaboliques de manière similaire à RAS, afin de maintenir le phénotype transformé des cellules. Il serait donc important dans le futur d'étudier comment l'autophagie module les voies métaboliques dans les cellules de cancer du sein présentant ce type d'altérations génétiques.

3.2.4 Mort cellulaire de type II

Une activation prolongée de l'autophagie conduit à un recyclage des protéines et organites au-delà du seuil de survie, pouvant induire la mort des cellules cancéreuses déficientes en apoptose (Wang *et al*, 2015). Cependant, le concept de « mort autophagique » a été sujet à de nombreuses controverses. En effet, ce processus de mort a tout d'abord été décrit avec la présence d'autophagosomes (Schweichel & Merker, 1973) mais dans de nombreux cas, l'autophagie est induite par les cellules mourantes dans le but ultime de résister au stress (Boya *et al*, 2005). La mort autophagique est donc définie comme une mort non apoptotique, associée à une augmentation du flux autophagique dans les cellules mourantes et pouvant être évitée par l'inhibition de l'autophagie. L'induction de mort de type II dans les cellules cancéreuses pourrait ainsi devenir une stratégie thérapeutique (pour une revue, voir Eisenberg-Lerner *et al*, 2009).

3.2.5 Cellules souches cancéreuses

Des études récentes ont montré l'existence d'une hiérarchie au sein des tumeurs, préservée par une sous-population de cellules tumorales, appelées cellules souches cancéreuses (CSCs), douées de capacités d'auto-renouvellement et de différenciation (Clarke *et al*, 2006). Les CSCs seraient responsables de la progression tumorale, de la formation de

métastases ou encore de résistances aux traitements (pour une revue, voir Gangemi *et al*, 2009). Il semblerait que le processus autophagique soit nécessaire à la survie et les capacités tumorigènes des CSCs de cancer du sein (Yue *et al*, 2013; Cufi *et al*, 2011; Gong *et al*, 2013). En effet, les CSCs de cancer du sein présentent un flux autophagique plus élevé que les autres cellules cancéreuses et l'inhibition de l'autophagie par l'extinction de *BECLIN1* dans des CSCs provenant de la lignée MCF-7, mise en culture sous forme de mammosphères, conduit à une diminution de leur capacité à former des tumeurs *in vivo*, alors que l'inhibition de l'autophagie augmente la capacité des cellules MCF-7 adhérentes à former des tumeurs *in vivo* (Gong *et al*, 2013). Ces données suggèrent que l'autophagie peut avoir un rôle pro-tumoral dans les CSCs, mais des travaux sont encore nécessaires afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la survie des CSCs. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie pourrait alors devenir une stratégie thérapeutique très prometteuse pour sensibiliser les CSCs aux thérapies déjà existantes et réduire le risque de rechutes chez les patientes atteintes de cancer du sein.

3.3 Cibler l'autophagie dans les cancers du sein

3.3.1 Inhiber l'autophagie pour augmenter l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses

Malgré de nombreuses avancées dans le traitement des cancers, il subsiste encore des tumeurs présentant des résistances aux thérapies existantes. Une induction de l'autophagie est régulièrement observée dans les cellules tumorales à la suite d'un traitement anti-cancéreux, ce qui permet une protection contre la mort par apoptose induite par ces thérapies (pour une revue, voir White & DiPaola, 2009). Par exemple, le tamoxifène (un anti-estrogène) est capable d'induire l'autophagie dans les cellules MCF-7 (Bursch *et al*, 1996). L'induction de l'autophagie permet aux cellules tumorales de survivre dans ces conditions de stress induites par les thérapies. L'utilisation combinée d'inhibiteurs de l'autophagie (pharmacologique ou par l'utilisation de siRNA) et de tamoxifène permet de favoriser la cytotoxicité et de prévenir l'apparition de résistances liées à cette thérapie anti-estrogénique (Samaddar *et al*, 2008; Qadir *et al*, 2008; Schoenlein *et al*, 2009). Les résistances aux anti-estrogènes étant très fréquentes (environ 30 % des patientes RE⁺), l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie en combinaison avec les thérapies ciblées dans les cancers du sein RE⁺ pourrait être potentiellement bénéfique pour ce type de patientes. Cependant, à ce jour, aucun essai clinique n'est en cours pour tester ce type de combinaison. De manière similaire, une

augmentation de l'autophagie est un processus observé dans les cellules de cancer du sein HER2⁺, ce qui leur permet de résister au trastuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre HER2, en contrebalançant les signaux apoptotiques induits par cette thérapie (Vazquez-Martin *et al*, 2009). La radiothérapie est également un inducteur de l'autophagie dans les cellules de cancer du sein (Paglin *et al*, 2001). L'inhibition de l'autophagie par des siRNA permet de restaurer la sensibilité de cellules résistantes à la radiothérapie en induisant leur mort par apoptose (Apel *et al*, 2008).

Ces études présagent des résultats très prometteurs quant à l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie dans les thérapies contre les cancers du sein. Des études cliniques de phase I/II qui utilisent des dérivés de la chloroquine, qui empêchent l'acidification des lysosomes et inhibent la maturation des autophagosomes (**Figure 17**) sont actuellement en cours. A ce jour, il existe cinq essais cliniques sur des patientes atteintes de cancer du sein, testant l'effet de la chloroquine et de l'hydroxychloroquine (une version moins toxique de la chloroquine (Gunja *et al*, 2009)), en combinaison ou non avec des chimiothérapies (clinicaltrials.gov, NCT01292408, NCT00765765, NCT01023477, NCT02414776 et NCT02333890).

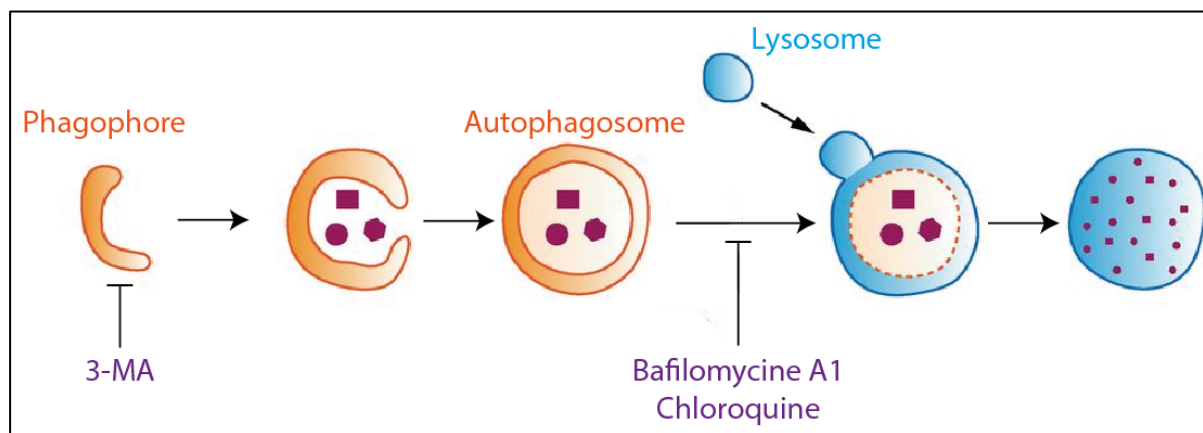


Figure 17 : Inhibiteurs de l'autophagie. La 3-méthyladénine (3-MA) inhibe les étapes précoces de l'autophagie, en inhibant la PI3K. La bafilomycine A1 (inhibiteur de V-ATPases) et la chloroquine (agent lysomotropique) inhibent la formation d'autophagolysosomes. En effet, ces deux composés préviennent l'acidification des lysosomes et inhibent la fusion des autophagosomes avec les lysosomes.

3.3.2 Induction de la mort autophagique

Les cellules cancéreuses présentent souvent un mécanisme apoptotique défectueux et ceci peut augmenter leur résistance aux thérapies conventionnelles. L'utilisation de voies alternatives induisant la mort est donc une stratégie très intéressante pour traiter les cancers (pour une revue, voir Schleicher *et al*, 2010). La mort autophagique peut être induite *in vitro*

dans certaines cellules cancéreuses (essentiellement celles présentant l'absence de modulateurs apoptotiques tels que BAX, BAK ou caspases) lorsqu'elles sont traitées par des chimiothérapies. En effet, il a été montré que le traitement de cellules MCF-7 par le fenrétinide, un dérivé synthétique de l'acide rétinoïque, conduit à l'augmentation de l'expression de BECLIN1 et du flux autophagique, conduisant à la mort autophagique des cellules MCF-7 (Fazi *et al*, 2008).

La rapamycine et ses analogues ciblent spécifiquement mTORC1 pour stimuler l'autophagie. Cependant, des essais cliniques ont montré une efficacité très limitée de ces composés (pour une revue, voir Meric-Bernstam & Gonzalez-Angulo, 2009). En effet, le complexe mTOR existe sous deux formes : mTORC1, qui régule négativement l'autophagie et stimule la synthèse de nucléotides et mTORC2, qui joue un rôle important dans la survie cellulaire, le métabolisme, la prolifération ainsi que l'organisation du cytosquelette (pour une revue, voir Francipane & Lagasse, 2015). Le développement de molécules inhibant à la fois mTORC1 et mTORC2, comme la torine 1 ou AZD2014, ont permis de potentialiser les effets anti-cancéreux. En effet, la molécule AZD2014 a montré des résultats très prometteurs et une bonne tolérance chez les patients, dans une étude clinique de phase I (Basu *et al*, 2015). Une étude clinique de phase II est actuellement en cours sur des patientes atteintes de cancer du sein RE⁺ (clinicaltrials.org, NCT02599714).

3.3.3 Cibler la régulation épigénétique des gènes de l'autophagie

Ces dernières années, des études ont montré que l'autophagie est régulée à la fois par des événements cytoplasmiques, comme décrit précédemment en « 2.2 », mais également par des événements nucléaires. En effet, des protéines ATG telles que BECLIN1 ou LC3B peuvent être retrouvées à la fois dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire (Liang *et al*, 2001; Huang *et al*, 2015). Dans le cas de BECLIN1, sa localisation nucléaire empêche l'activation de l'autophagie et inhibe sa fonction suppresseur de tumeur dans les cellules MCF-7 (Liang *et al*, 2001). De plus, de nombreux facteurs de transcription comme HIF1, FOXO3A ou encore TFEB peuvent réguler l'autophagie. Mais récemment, l'épigénétique a également été décrite comme étant un nouvel acteur majeur de la régulation de l'autophagie. En effet, les microARN (miARN), les méthylations de l'ADN ainsi que les modifications post-traductionnelles d'histones peuvent réguler l'expression des gènes de l'autophagie. Nous décrirons dans la suite de ce paragraphe le rôle de l'épigénétique dans la régulation de l'autophagie dans les cancers.

3.3.3.1 Méthylations de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus étudiée et joue un rôle essentiel dans l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans la cancérogenèse. Dans le génome des mammifères, la méthylation de l'ADN est généralement caractérisée par la modification de résidus cytosine dans un dinucléotide CpG. Ces dinucléotides ne sont pas uniformément distribués dans le génome humain, mais plutôt concentrés dans des zones peu étendues riches en CpG, appelées îlots CpG (*CpG Islands*) et des régions contenant des séquences répétées telles que les centromères (pour une revue, voir Bird, 2002; Takai & Jones, 2002). Les îlots CpG se localisent principalement à l'extrémité 5' des gènes et sont présents sur environ 60 % des promoteurs des gènes humains (Wang & Leung, 2004). Une méthylation aberrante sur les *CpG Islands* des promoteurs peut conduire à une baisse de la transcription ou à une absence totale de transcription du gène, pouvant ainsi permettre l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeur et ainsi favoriser des phénotypes pro-cancer (Jones & Takai, 2001).

L'inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation de l'ADN a été décrite dans la plupart des cancers. Par exemple, l'hyperméthylation du promoteur de *RASSF1A* (*Ras association domain family 1 isoform A*) est plus fréquemment visible dans le tissu de patientes présentant un haut risque d'atteinte par le cancer du sein (Lewis *et al*, 2005), suggérant que cet événement pourrait favoriser la tumorigenèse. De plus, une étude a montré que l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs peut être également associée à la progression tumorale. En effet, les auteurs ont montré que l'hyperméthylation de l'*E-cadhérine* est associée à un faible pronostic et un risque métastatique élevé dans les mélanomes (Venza *et al*, 2016). L'inactivation de ces gènes suppresseurs de tumeur peut ensuite réguler l'autophagie. C'est le cas par exemple de la protocadhérine 17 (*PCDH17*), dont l'expression génique est régulièrement inactivée par une hyperméthylation de son promoteur dans les cancers gastriques et colorectaux. *PCDH17* exerce son activité suppresseur de tumeur par l'induction de l'autophagie et de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Hu *et al*, 2013). Cependant, le lien entre méthylation du promoteur de *PCDH17* et autophagie reste encore à déterminer.

Des gènes codant les protéines ATG peuvent également être méthylés dans les cancers et cette modification est associée à la tumorigenèse et au développement des cancers. C'est le cas par exemple de *BECLIN1*, dont l'hyperméthylation du promoteur est associée à une expression significativement réduite dans les cancers du sein (Li *et al*, 2010). De plus, notre équipe a récemment montré que le promoteur de *GABARAPL1* est hyperméthylé dans des

tissus et modèles cellulaires de cancer du sein et que ce statut de méthylation est corrélé à la faible expression de *GABARAPL1* (Hervouet *et al*, 2015). D'autres études ont également montré une hyperméthylation d'autres gènes de l'autophagie, comme *BNIP3* dans les cancers gastriques et colorectaux (Murai *et al*, 2005), un variant de *LC3A* dans les cancers de l'œsophage (Bai *et al*, 2012) ou encore *ATG16L2* dans les cancers hématologiques (Dunwell *et al*, 2010).

Afin d'induire à nouveau l'expression des gènes hyperméthylés, l'utilisation d'agents déméthylants a été étudiée pour le traitement des cancers et à ce jour, la FDA a déjà approuvé l'azacitidine et la décitabine, deux inhibiteurs d'ADN méthyltransférases, pour le traitement de maladies atteignant les cellules souches hématopoïétiques présentant un haut risque de transformation en leucémie. Des études cliniques sont en cours afin de déterminer l'efficacité de ces agents déméthylants sur d'autres types de cancers, tels que les cancers du sein (clinicaltrials.org, NCT01349959, NCT01194908).

3.3.3.2 *Modifications post-traductionnelles des histones*

Les histones sont des protéines nucléaires associées à l'ADN qui participent à la formation de la chromatine et au niveau de condensation de l'ADN. Ces protéines contiennent une extrémité N-terminale qui peut subir différentes modifications post-traductionnelles, telles que des méthylations, acétylations, ubiquitinations, sumoylations ou phosphorylations de résidus spécifiques (pour une revue, voir Sadakierska-Chudy & Filip, 2015). L'acétylation est la modification post-traductionnelle des histones la plus couramment étudiée et est réalisée par des histones acétyltransférases (HAT) et retirée par des histones désacétylases (HDAC). De manière générale, les HATs activent la transcription du gène alors que les HDACs inhibent sa transcription. Ainsi, une étude a montré une perte globale de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac) dans des cellules tumorales, telle que des cellules de cancer du sein (Fraga *et al*, 2005). L'induction de l'autophagie est associée à une diminution globale de la marque H4K16ac, par la régulation négative de l'HAT hMOF (*human males absent on the first*). La baisse d'activité d'hMOF permet d'inhiber l'expression de gènes de l'autophagie afin de prévenir une induction prolongée de ce mécanisme qui pourrait devenir létale (Füllgrabe *et al*, 2013). Notre équipe a également montré une désacétylation de l'histone H3 au niveau du promoteur de *GABARAPL1* dans des cellules de cancer du sein (Hervouet *et al*, 2015).

Les enzymes contrôlant l'acétylation des histones ne régulent pas uniquement l'expression des gènes et la fonction des protéines, mais sont également impliquées dans la

régulation de nombreux processus cellulaires, tels que l'apoptose ou la réparation de l'ADN (pour une revue, voir Marks *et al*, 2001) ou l'autophagie (Robert *et al*, 2011). Par exemple, la déplétion d'HDAC5 dans les cellules MCF-7 induit l'autophagie et permet de réduire la croissance tumorale *in vivo* et d'augmenter l'efficacité de chimiothérapies *in vitro* (Peixoto *et al*, 2012). De plus, comme décrit précédemment, SIRT1 peut réguler l'autophagie en désacétylant directement des protéines ATG telles qu'ATG5, ATG7 ou LC3 (Lee *et al*, 2008, 1; Huang *et al*, 2015).

La surexpression d'HDACs est généralement associée à un faible pronostic dans les cancers comme par exemple, HDAC2 qui est surexprimée dans les cancers du sein (Zhao *et al*, 2016). Aucun lien direct n'a été pour l'instant montré entre l'expression d'HDAC2 et l'autophagie mais, la délétion simultanée d'HDAC1 et HDAC2 chez la souris bloque l'induction et la formation d'autophagosomes (Moresi *et al*, 2012). Des inhibiteurs d'HDACs sont en cours de développement pour traiter les cancers. A ce jour, quatre inhibiteurs d'HDACs ont été approuvés par la FDA : le SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*), la romidepsine et le belinostat pour le traitement de lymphomes (Mann *et al*, 2007; VanderMolen *et al*, 2011; Lee *et al*, 2015) et le panobinostat pour le traitement de myélomes (Laubach *et al*, 2015). Un traitement avec le SAHA peut aussi stimuler l'autophagie et induire la mort de cellules MCF-7 résistantes au tamoxifène (Lee *et al*, 2012).

3.3.3.3 Les miARNs

Les miARNs sont des ARN non codants de petite taille (18 à 22 nucléotides) qui exercent leur fonction de régulation épigénétique par le ciblage d'ARNm au niveau de l'extrémité 3' non traduite, juste après leur transcription (pour une revue, voir Bartel, 2004). Ceci conduit au clivage de l'ARNm cible par la ribonucléase Ago2 dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) ou à l'inhibition de sa traduction (pour une revue, voir He & Hannon, 2004). Les miARNs sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires et la dérégulation de leur expression est liée à des maladies telles que le cancer. Le rôle des miARNs dans l'autophagie est important mais aussi très complexe car ils sont également dégradés par autophagie afin de maintenir l'homéostasie des miARNs intracellulaires.

La régulation de l'autophagie par les miARNs a été démontrée pour la première fois par Zhu et ses collaborateurs. Ils ont ainsi montré que le *miARN-30a* (*miR-30a*) régule négativement l'autophagie en ciblant spécifiquement l'ARNm de *BECLIN1* et en réduisant ainsi son expression (Zhu *et al*, 2009). Récemment, il a été montré que d'autres miARNs

pouvaient réguler l'expression de protéines qui ont un rôle dans la régulation de l'autophagie ainsi que d'autres protéines ATG, à différentes étapes de ce processus. Par exemple, *miR-25* régule l'étape d'initiation en ciblant l'expression d'ULK1 et l'expression de *miR-25* est corrélée à la résistance à l'épirubicine dans les cellules MCF-7 (Wang *et al*, 2014). De plus, *miR-101* régule, quant à lui, l'étape d'élongation de l'autophagosome en ciblant le gène *ATG4D* et son expression permet d'inhiber l'induction de l'autophagie dans les cellules MCF-7 traitées avec du tamoxifène, ceci augmentant la sensibilité de ces cellules à cette drogue (Frankel *et al*, 2011). Le *miARN-195* (*miR-195*) régule quant à lui la prolifération, la migration, l'angiogenèse et l'autophagie dans les cellules endothéliales progénitrices en conditions hypoxiques en ciblant *GABARAPL1* (Mo *et al*, 2016). Le rôle des miARNs dans la régulation de l'autophagie et leur utilisation en thérapie anti-cancéreuse restent encore cependant très controversés. Des études sont encore nécessaires afin de déterminer la meilleure façon de mettre en place en clinique des thérapies basées sur l'utilisation des miARNs.

Les modifications épigénétiques jouent un rôle essentiel dans les cancers et ce nouvel axe de recherche est devenu très prometteur pour la mise au point de nouvelles thérapies anti-tumorales. Cependant, le lien complexe qui existe entre l'épigénétique et l'autophagie n'a pas encore été complètement élucidé. Une étude très récente a montré une hyperméthylation des gènes *ATG2B*, *ATG4D*, *ATG9A* et *ATG9B* associée à une diminution de leur expression dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein invasif (Zhang *et al*, 2016), suggérant que l'inhibition de la transcription de gènes de l'autophagie jouant un rôle dans les étapes précoces de ce processus, pourrait être à l'origine de son inhibition dans les cancers du sein invasifs

RESULTATS

1. Contexte de l'étude

Notre équipe de recherche, qui a découvert le gène *GABARAPL1* en 1993, a par la suite démontré son implication dans le transport intracellulaire de récepteurs, dans l'autophagie (Mansuy *et al*, 2004; Chakrama *et al*, 2010), mais que ce gène pouvait également être considéré comme un gène suppresseur de tumeur. En effet, notre laboratoire a mis en évidence une perte de l'expression de *GABARAPL1* dans des tissus cancéreux, comparé à des tissus normaux (Nemos *et al*, 2003), mais également qu'une forte expression de *GABARAPL1* est associée à un bon pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein (Berthier *et al*, 2010). De plus, des études *in vitro* effectuées au laboratoire ont montré qu'une surexpression de *GABARAPL1* dans des cellules MCF-7 inhibe la prolifération de ces cellules et que son extinction dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-436 induit une augmentation de la prolifération ainsi que la formation de colonies en agar mou (Berthier *et al*, 2010; Boyer-Guittaut *et al*, 2014). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par une autre équipe, qui a montré que la surexpression de *GABARAPL1* dans les cellules MCF-7 inhibe la croissance tumorale (Zhang *et al*, 2011). Puisque l'altération de l'expression de gènes dans les cancers peut notamment être associée à des anomalies génétiques, telles que des mutations de l'ADN ou des délétions chromosomiques, ou à des altérations épigénétiques, telles qu'une hyperméthylation du promoteur ou des modifications post-traductionnelles des histones, l'objectif initial de mon travail de thèse a été d'étudier la régulation épigénétique de *GABARAPL1*, afin de déterminer si des modifications épigénétiques pouvaient expliquer sa différence d'expression dans les tissus tumoraux et notamment dans les cancers du sein.

2. Régulation épigénétique de l'expression du gène *GABARAPL1* dans les cancers du sein

Une forte expression de *GABARAPL1* étant associée à un bon pronostic dans les cancers du sein (Berthier *et al*, 2010), nous avons souhaité étudier son expression ainsi que celle des autres membres de sa famille, *GABARAP* et *GABARAPL2*, en fonction du grade histopronostic de Elston-Ellis. Pour cela, nous avons utilisé une nouvelle cohorte de patientes atteintes de cancers du sein comprenant 13 biopsies de tissu tumoral et 9 échantillons de tissu non-tumoral. Le grade de chaque tumeur a été déterminé par un examen anatomopathologique

évaluant trois critères morphologiques : l'architecture des cellules tumorales, la forme de leurs noyaux ainsi que l'activité mitotique (Elston & Ellis, 1991). La valeur du grade (I à III) est proportionnelle à l'agressivité de la tumeur. Dans notre cohorte, nous avons analysé l'expression des gènes *GABARAP*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* dans 5 échantillons de patientes de grade I (patientes de type luminal A) et 8 biopsies de grade III (5 patientes triple négatives et 3 patientes luminal B). Cette analyse de l'expression de ces trois gènes a permis de montrer une corrélation inverse entre l'expression de *GABARAPL1* et le grade de la tumeur. Nous avons également observé une baisse, mais non significative, de l'expression de *GABARAP* et *GABARAPL2* dans les tissus de grade III comparé aux tissus non tumoraux.

L'analyse bio-informatique (MethPrimer) des promoteurs des gènes *GABARAP*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* a montré l'existence de zones riches en CpG, des cibles préférentielles de la méthylation, au niveau de ces séquences. Nous avons donc analysé le statut de méthylation de ces différents promoteurs à partir d'ADNg extraits des patientes de notre cohorte. Cette étude a montré un faible taux de méthylation des promoteurs *GABARAP* et *GABARAPL2*, à la fois dans les tissus non-tumoraux et cancéreux, alors que le promoteur de *GABARAPL1*, qui n'est pas ou très peu méthylé dans les tissus non-tumoraux, présente un fort taux de méthylation dans les tissus cancéreux. Ces résultats suggèrent donc que la diminution de l'expression de *GABARAPL1* dans les cancers du sein pourrait être associée à la méthylation de son promoteur.

Afin de mieux comprendre les mécanismes associés à la modification épigénétique du promoteur de *GABARAPL1*, nous avons souhaité étudier la régulation de l'expression de ce gène dans les lignées de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-453 comparé aux cellules de sein immortalisées non-tumorales MCF 10A car nous avons montré que l'expression de *GABARAPL1* est significativement diminuée dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-543 comparé aux cellules MCF 10A. Nous avons alors montré que cette baisse d'expression de *GABARAPL1* est associée à un taux élevé de méthylation, ainsi qu'à la présence de DNMT1 (*DNA methyl transferase 1*) sur son promoteur, une enzyme qui catalyse la méthylation de maintenance. Ces données suggèrent que les cellules de cancer du sein étudiées présentent effectivement une augmentation de la méthylation du promoteur de *GABARAPL1*.

La méthylation de l'ADN étant souvent associée à une désacétylation d'histones, nous avons analysé l'acétylation de l'histone H3 au niveau du promoteur de *GABARAPL1* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-453. Les résultats ont montré l'absence d'acétylation de l'histone H3 sur le promoteur de *GABARAPL1*, ainsi que la présence de l'histone désacétylase 1 (HDAC1).

Nous avons également montré qu'un traitement des cellules MCF-7 et MDA-MB-453 avec le 5-aza-CdRdéoxycytidine (un inhibiteur des DNMTs) ou avec la Trichostatine A (TSA, un inhibiteur des HDACs) augmente de manière significative l'expression de l'ARNm de *GABARAPLI*, ainsi que de la protéine.

Un des modèles de la régulation génique par des modifications épigénétiques est la régulation de l'accès des promoteurs aux facteurs de transcription. Dans le but de caractériser les mécanismes permettant l'expression de *GABARAPLI* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-453, des fragments du promoteur de *GABARAPLI* ont été clonés dans un plasmide contenant le gène rapporteur luciférase. Des expériences de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*, immunoprécipitation de chromatine) ont ainsi montré que le facteur de transcription CREB-1 est recruté au niveau du promoteur de *GABARAPLI*. De plus, la surexpression de CREB-1 dans les cellules MCF-7 permet d'augmenter de manière significative l'expression de *GABARAPLI*, mais avec une moins bonne efficacité qu'un traitement combiné de 5-aza-CdRdéoxycytidine et de TSA. De plus, le pré-traitement de cellules MCF-7 avec 5-aza-CdRdéoxycytidine et la TSA permet l'augmentation du recrutement de CREB-1 au niveau du promoteur de *GABARAPLI*, suggérant que les modifications épigénétiques peuvent être un facteur permettant le recrutement de CREB-1 sur le promoteur de *GABARAPLI*.

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

Publication I:

The autophagy *GABARAPL1* gene is epigenetically regulated in breast cancer models

Hervouet E, **Claude-Taupin A**, Gauthier T, Perez V, Fraichard A, Adami P, Despouy G, Monnien F, Algros MP, Jouvenot M, Delage-Mourroux R and Boyer-Guittaut M.

***BMC Cancer* (2015)**

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The autophagy *GABARAPL1* gene is epigenetically regulated in breast cancer models

Eric Hervouet^{1*}, Aurore Claude-Taupin¹, Thierry Gauthier¹, Valérie Perez¹, Annick Fraichard¹, Pascale Adami¹, Gilles Despouy¹, Franck Monnier², Marie-Paule Algros², Michèle Jouvenot¹, Régis Delage-Mourroux¹ and Michaël Boyer-Guittaut¹

Abstract

Background: The GABARAP family members (GABARAP, GABARAPL1/GEC1 and GABARAPL2 /GATE-16) are involved in the intracellular transport of receptors and the autophagy pathway. We previously reported that *GABARAPL1* expression was frequently downregulated in cancer cells while a high *GABARAPL1* expression is a good prognosis marker for patients with lymph node-positive breast cancer.

Methods: In this study, we asked using qRT-PCR, western blotting and epigenetic quantification whether the expression of the *GABARAP* family was regulated in breast cancer by epigenetic modifications.

Results: Our data demonstrated that a specific decrease of *GABARAPL1* expression in breast cancers was associated with both DNA methylation and histone deacetylation and that CREB-1 recruitment on *GABARAPL1* promoter was required for *GABARAPL1* expression.

Conclusions: Our work strongly suggests that epigenetic inhibitors and CREB-1 modulators may be used in the future to regulate autophagy in breast cancer cells.

Keywords: Autophagy, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, Breast cancer, CREB-1, DNA methylation, Epigenetics

Background

Autophagy is a cell process which regulates cell homeostasis and survival by inducing the degradation and recycling of intracellular components like protein aggregates or organelles (such as damaged mitochondria) [1]. This mechanism involves more than 40 proteins required for : i) the formation of autophagosomes, ii) the fusion of autophagosomes with lysosomes and/or, iii) the regulation of autophagy flux. The role of autophagy in tumorigenesis is controversial, even though evidence indicated that autophagy is often downregulated in cancer cells. On one hand, autophagy might protect against transformation of non tumoral cells into cancer cells and in the other hand,

a loss of autophagy might help the cancer cells to escape from type II cell death (also called autophagy cell death) [2, 3]. Since induction of autophagy in cancer cells has also been described to confer resistance to chemotherapeutic agents, the co-administration of both alkylating agents and autophagy inhibitors (such as hydroxychloroquine) could improve the anti-tumoral response in these resistant cells [4]. Among the proteins involved in autophagy, two sub-families of homologs of the yeast Atg8 (Autophagy-related 8) have been described in mammals: i) the MAP-LC3s (Microtubule-associated protein Light Chain 3) including LC3A, LC3B and LC3C and, ii) the GABARAP (GABA_A-receptor-associated protein) family. The latter comprises 3 members: GABARAP, GABARAPL1/GEC1/ATG8L (GABARAP-like protein 1/guinea-pig endometrial glandular epithelial cells-1/Atg8-like protein) and GABARAPL2/GATE-16 (GABARAP-like protein 2/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa).

* Correspondence: eric.hervouet@univ-fcomte.fr

¹Université 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

Full list of author information is available at the end of the article

GABARAP, *GABARAPL1* and *GABARAPL2* genes are located on the human chromosomes, 17p13.12, 12p12.3 and 16q22.3 respectively, and are differentially expressed in normal and pathological tissues. The *GABARAP* gene has been described to be highly expressed in endocrine tissues while the *GABARAPL1* gene is predominantly expressed in the central nervous system but they both are underexpressed in a large variety of cancer cell lines [5]. Nevertheless, the analysis of *GABARAPL1* expression in a cohort of 256 breast adenocarcinoma revealed that a low *GABARAPL1* expression was correlated with a high risk of metastasis, in particular for lymph node-positive patients [6]. Despite these recent studies, the regulation of the *GABARAP* family is still poorly understood and the origin of their decreased expression in tumor models remains unknown.

It is now recognized that epigenetic modifications control the expression of numerous genes *via* the regulation of promoter accessibility to transcriptional factors. Both DNA methylation and histone modifications affect the level of chromatin compaction and it has been described that epigenetically-mediated aberrant silencing of genes are an important factor in the pathogenesis of cancers including breast cancers (BC) [7, 8]. Indeed, epigenetic modifications can regulate the expression of a large panel of genes involved in the hallmarks of cancer, such as apoptosis, cell signaling, invasion and proliferation. For example, the detection of the promoter methylation of the tumor suppressor gene *BRCA1*, which is frequent in BC and is associated with a decrease of *BRCA1* expression, can help to predict the response to conventional chemotherapies in triple negative BC patients [9]. DNA methylation consists on the addition of a methyl group on a cytosine in CpG islands. It is catalyzed by DNA methyl transferases (DNMTs) and is unfavorable to transcription. Following DNA replication and formation of hemi-methylated DNA, the conservation of DNA methylation on the neo-synthesized strand, is mainly processed by DNMT1 using the parental strand as a model. This DNA methylation conservation is called maintaining or inheritance DNA methylation. On the opposite, *de novo* DNA methylation referred to the addition of DNA methylation on both strands of DNA on previously unmethylated loci is catalyzed by both DNMT3A and DNMT3B.

Besides DNA methylation, post-translational modifications of histones are also frequently associated to the regulation of gene expression in cancers. Histones are associated as octamers in nucleosomes (dimer of H2A, H2B, H3 and H4 and a loop of 126 pb DNA) whose compaction is regulated by post-translational modifications such as phosphorylation, methylation or acetylation. The local sum of these modifications is called the histone code and determine the status of local chromatin compaction (for a review see [10]). Histone methyl transferases (HMTs)

or histone demethylases (HDMs) respectively catalyze the methylation or demethylation of histones leading to different effects on transcription. For example, H3K9me or K3K27me are negative marks while H3K4me is favorable to transcription. Acetylation, the most studied histone modification, is processed by histone acetyl transferases (HATs) and is associated with a local relaxed chromatin and is therefore favorable to gene expression. On the opposite, the removal of acetyl groups from histones, which is catalyzed by histone deacetylases (HDACs), contributes to gene silencing.

Some recent studies also revealed that epigenetic modifications can regulate autophagy gene expression as well as autophagy levels in both normal and cancer cells. For example, HDACs play an essential role in the regulation of autophagy: HDAC1 inhibition favors the conversion of the soluble LC3B form (LC3B-I) to the membrane-bound form of LC3B (LC3B-II), while the presence of H4K16ac (catalyzed by hMOF (human ortholog of drosophila males absent in the first)) in some *ATGs* genes, is associated to a decrease of expression of these genes [11, 12]. Moreover, HDAC6, an HDAC mainly localized in the cytosol, has also been described to be involved in the transport and maturation of autophagosomes [13]. DNA methylation is also involved in autophagy regulation as hypermethylation of several *ATG* genes has been described in various cancers [13, 14]. For example, methylation of *BECN-1*, a tumor suppressor gene, has been observed in BC, while methylation of *ATG16L2*, *LC3A*, *ULK2*, or *BNIP3* has been suggested to be involved in the down-regulation of autophagy in other cancers [15–19].

In order to characterize the regulation of *GABARAP* gene family expression in cancer cells, we analyzed their expression and the epigenetic modifications in the promoters of these genes in *in vitro* human BC cell models. Our data demonstrated that *GABARAPL1* expression is decreased in BC patients and BC cell line models. Moreover, both DNA methylation and deacetylation of histone H3 in *GABARAPL1* promoter were observed in these BC cell line models while the inhibition of DNMTs and HDACs using specific inhibitors restored *GABARAPL1* expression in these cells. These data suggest that DNMTi (DNMT inhibitors) and HDACi (HDAC inhibitors) could be used in the future to modulate autophagy levels in BC cells.

Methods

Ethic statement

Human samples were collected according to French laws and the recommendations of the French National Committee of Ethics. Indeed, this study has been approved by of the scientific committee of “the tumoroth que r gionale de Franche-Comt BB-0033-00024”. The samples and the medical history of patients were encoded to protect

patients confidentiality and used under protocols approved by the recommendations of the French national Committee of Ethics. All human samples were collected by Pr. Severine Valmary-Degano (Centre Hospitalo-Universitaire, Besan on, France) at the Tumoroth que r gionale de Franche-Comt BB-0033-00024 . Collection of samples and their use (AC-2010-1163) for studies (approved by the scientific committee of the tumoroth - que r gionale de Franche-Comt BB-0033-00024) have been approved by the French minist re de la recherch and by the CPP EST II. We obtained all necessary consents from any patients involved in the study.

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated from cells and frozen tissues using Tri Reagent (Molecular Research Center, TR-118) as described by the manufacturer. Reverse transcription were performed using M-MLV (Sigma-Aldrich, M-1302) reverse transcriptase and 1.5 µg total RNA according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Quantitative PCR (qPCR) were done in duplicate using the Step one Real-Time PCR system (Applied Biosystems), Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4367659), according to manufacturer's instructions and primers specific of *GABARAP* (F: 5'-GCCTTTCCCATCCTGCTGTA-3' and R: 5'-AGGAGGGGATTGCTGGGTTCT-3') ; *GABARAPL1* (F: 5'-CCCTCCCTTGGTTATCATCCA-3' and R: 5'-ACTCCCACCCACAAAATCC-3') and *GABARAPL2* (F: 5'-AAATATCCCGACAGGGTTCC-3' and R: 5'-CAGGAAGATCGCCTTTTCAG-3'). *H3B2* was used as an housekeeping gene (F: 5'-GCTAGCTGGATGTCTTTTGG-3' and R: 5'-GTGGTAAAGCACCCAGGAA-3') as previously described [20].

Cell culture

MCF-7 and MDA-MB-453 cell lines were obtained from ATCC (HTB-130 and HTB-22) and grown in DMEM 1 g/L glucose (Dominique Dutscher, L0066) containing fetal calf serum (5 %) (Dominique Dutscher, S1810), penicillin (50 U/ml) (Dominique Dutscher, L0018), streptomycin (50 µg/ml), and amphotericin B (1.25 µg/ml) (PAA, P11-001) at 37 °C in 5 % CO₂, and routinely used at 70–80 % confluence. When indicated, cells were exposed

to 2 µM 5-aza-CdR (A3656, Sigma-Aldrich) for 48 h and 400 nM TSA (T8552, Sigma-Aldrich) for 16 h.

Luciferase activity

GABARAPL1 promoter fragments were obtained by PCR using the following primers 336 F: 5'-GCTGGATCCC AACCCAGCAGGA-3', -659 F: 5'-GTCAGGCTGGTCTC GAACTC-3' and +241 R: 5'-GGGATGCACCGCAGGG CTTCC-3' and then cloned into the pGL3 basic plasmid. 5000 cells were seeded in 96 multiwell dishes and cells were transfected with pGL3 plasmids, co-transfected with the pCDNA3.1-CREB-1 vector (kindly provided by Vincent Coulon, Montpellier, France) or treated with 10 µM forskolin. Luciferase expression was measured using the Luciferase Assay System kit (E1500, Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Epigenetics

gDNA was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (740952, Macherey Nagel). Global DNA methylation was quantified using the MethylFlash methylated DNA quantification kit (P-1034, Epigentek, France). Methyl DNA collection were performed using the Methyl-Collector Ultra kit (55005, Active Motif). Histone 3 acetylation was quantified using the EpiQuik Tissue Acetyl-Histone H3 ChIP Kit (P-2012, Epigentek). ChIP was performed using the ChIP-IT High Sensitivity kit (53040, Active Motif) with ChIP grade antibodies (Table 1). All these kits were used according to the manufacturer's instructions. Primers used in this study were designed with the primer3 software [21]: *GABARAP* (F: 5'-AAAGCCAACC GTCTTTGCTA-3' and R: 5'-GCCACTTCCCTATTCACCAA-3'), *GABARAPL1* (MC1 F: 5'-GTCAGGCTGGTC TCGAACTC-3' and R: 5'-CGCTCCTGAACAGCAACA TA-3') and *GABARAPL1* (MC2 F: 5'-AAGGAAACGCA GTGAGACAGA-3' and R: 5'-AGCTGGGAGCACAAAA ACAG-3'), *GABARAPL2* (F: 5'AATTCCCCAGACTTCCC CTA-3' and R: 5'-GGTGGCGAAGAAGTTGGTTA-3').

Western-blotting

Cells were scraped, harvested and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton ×100, 0.5 % DOCA, 0.1 % SDS) supplemented with protease inhibitors (104 mM AEBSE, 1.5 mM pepstatin A,

Table 1 List of antibodies

Antibody	Application	Dilution	Manufacturer	Ref
GABARAP/GABARAPL1	WB	1:3000	(Millipore, France)	#AB15278
GABARAPL2	WB	1:1000	(Proteintech, France)	#18727-AP
ACTIN	WB	1:3000	(Sigma-Aldrich, France)	#A5060
CREB-1	IF/ChIP	1:50/1 µg	(Santa-Cruz Biotechnology, France)	#sc-374227
DNMT1	ChIP	1 µg	(Active Motif, Belgium)	#39204
HDAC1	ChIP	1 µg	(Active Motif, Belgium)	#40967

1.4 mM E-64, 4 mM bestatin, 2 mM leupeptin, 80 μM aprotinin) for 30 min on ice, sonicated for 15 sec and centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4 °C. Supernatant was used for protein quantification using the Bradford method [22] and then proteins (40 μg) were separated using SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, 162 0177) for 2 h in Tris-Glycine buffer as previously described [23]. Membranes were saturated in 0.1 % TBS-Tween 20 and 5 % nonfat milk for 1 h and then incubated with primary antibodies (Table 1) overnight at 4 °C. Membranes were washed 3 times with TBS-Tween 20 0.1 %, incubated with secondary anti-rabbit HRP conjugate or anti-mouse HRP conjugate antibody according to manufacturer's instructions (P.A.R.I.S., BI2407 and BI2413C). The membrane was washed 3 times with TBS-0.1 % Tween 20 incubated with ECL revelation buffer (Pierce) and chemiluminescence was monitored using a ChemiDoc™XRS+ (Biorad).

Immunofluorescence

CREB-1 IF was performed as precognized by the manufacturer. Briefly, cells were seeded on coverslips in 24 multiwell-plates, fixed and permeabilized for 20 min with cold methanol at 20 °C, washed 3 times with cold PBS (Phosphate buffer saline : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), incubated with 1 % BSA-PBS for 1 h at 37 °C and incubated overnight with the CREB-1 antibody (Table 1). The coverslips were washed 3 times for 5 min with 0.1 % Tween-PBS (T-PBS), incubated for 1 h with a goat secondary anti-mouse Alexa 555 antibody (Life technology, France) and washed 3 times for 5 min with (T-PBS). Cells were then mounted in Vectashield Hardset mounting medium (Vector Laboratories, H-1000) and analyzed using an Olympus IX81 confocal microscope (Olympus, France).

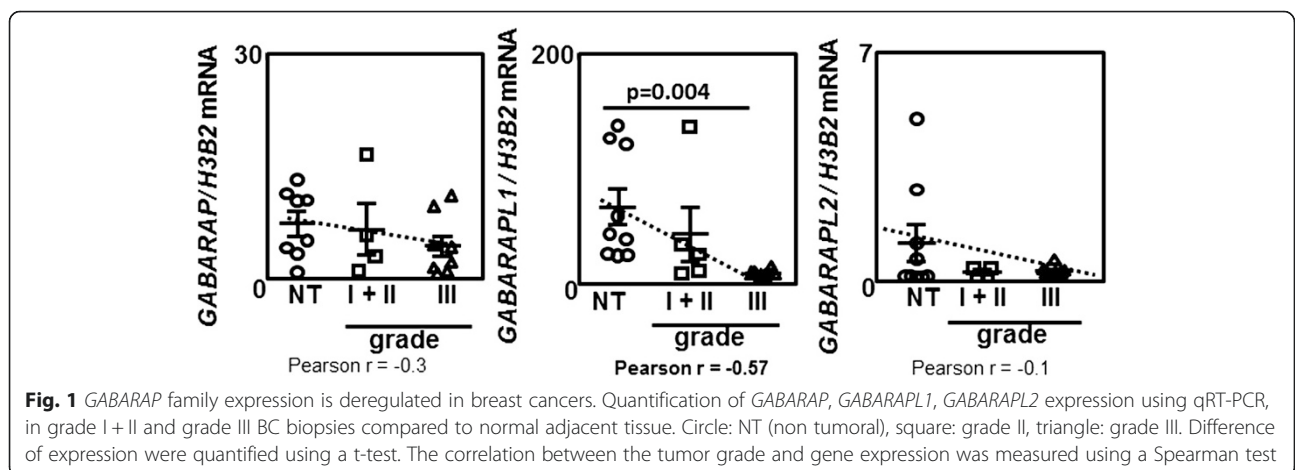
Statistics

Mean's comparison were analyzed using a Student t-test with GraphPad Prism5 software (USA). Correlation indexes were measured using a Spearman test with ImageJ software. Significant values were highlighted in bold in each figure.

Results

GABARAP family genes are differentially expressed in human breast cancer biopsies

We first analyzed *GABARAP*, *GABARAPL1* or *GABARAPL2* mRNA expression in human BC biopsies using qRT-PCR (Fig. 1). The different BC subtypes are classified in regard of their molecular marker expression. Luminal BC, which represent 50 % of total BC and generally associated with a good prognosis, are divided in Luminal A and Luminal B BC. Both Luminal A and B BC express ERα (estrogen receptor: ER+) whereas the expression of the *HER2* (*HER+*) (human epidermal growth factor receptor) gene was only observed in Luminal B BC. *HER+* BC subtype, which represents 17 % of BC, presents an amplification of the *HER2* gene without the expression of ERα (*ER-*). The triple negative BC (*ER-/PR-/HER-*) do not express ERα, PR (progesterone receptor) and *HER2* and cannot be treated with specific therapies (for a review, see [24]). Our cohort comprised 5 grade I BC (*ER+/PR+/HER-*) and 8 grade III BC (5 *ER-/PR-/HER-* and 3 *ER+/PR+/HER+*). Our results revealed an insignificant decrease of both *GABARAP* and *GABARAPL2* mRNA levels in grade III BC compared to non tumoral tissue (NT). More interestingly, *GABARAPL1* expression was strongly decreased in BC grade III tissues ($p = 0.004$) versus non tumoral tissues. An inverse correlation ($r = -0.57$) was also observed between *GABARAPL1* mRNA and tumor stage while a very poor correlation was determined between *GABARAP* or *GABARAPL2*

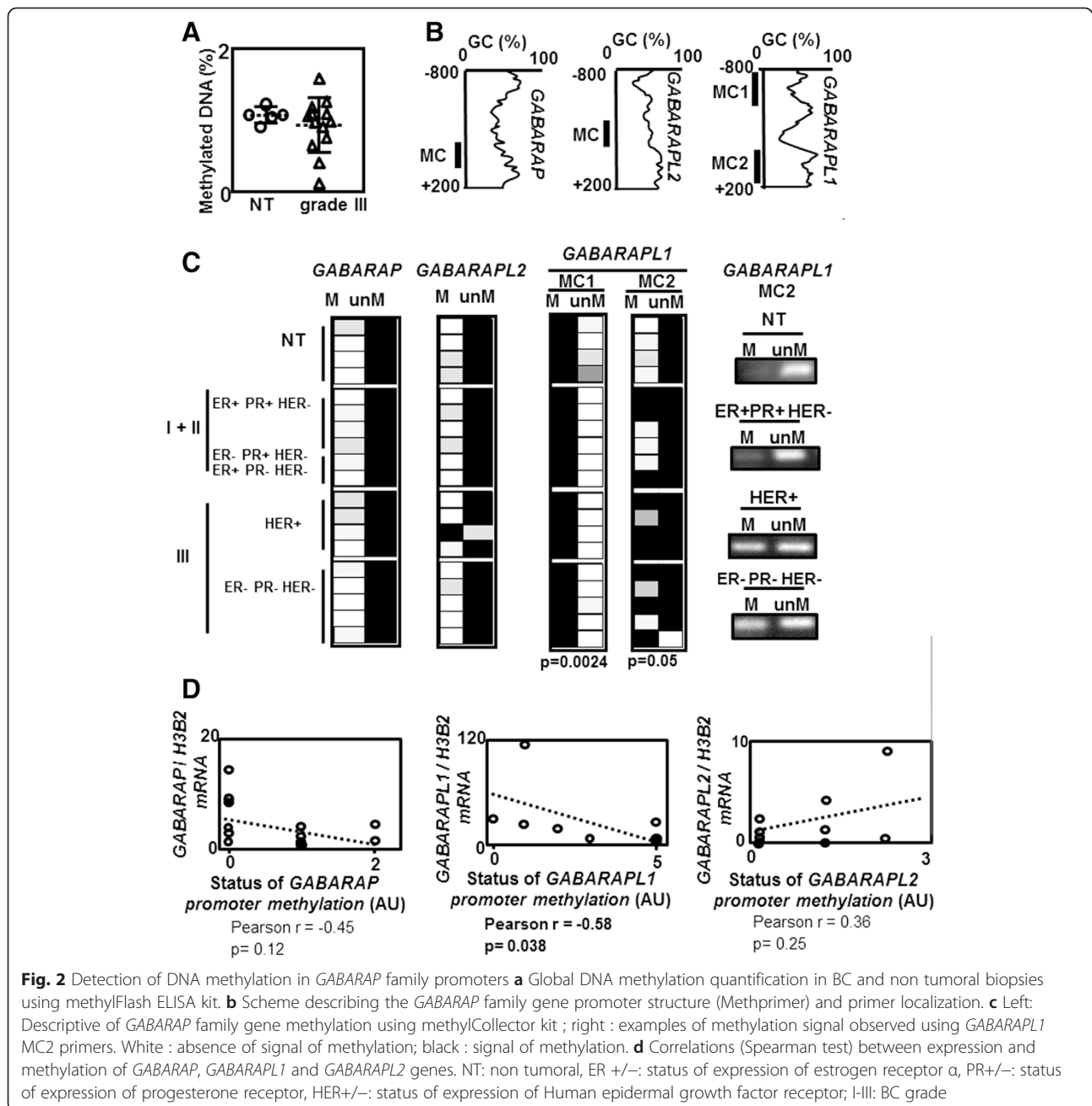


expression levels and the tumor grade (respectively $r = -0.3$ and $r = -0.1$).

Study of global and local epigenetic modifications in GABARAPL1 promoter and GABARAPL1 expression in BC tissues and cell models

Since tumors are frequently associated with aberrant DNA methylation content, we quantified global DNA methylation levels using ELISA in gDNA issued from both grade III BC samples (associated with the lowest expression of GABARAPL1 mRNA, as previously described in Fig. 1 and NT tissues (Fig. 2a).⁷ [25, 26] As

expected, several gDNA issued from grade III BC presented a lower global DNA methylation compared to gDNA issued from NT tissues. These results suggested that epigenetic modifications might occur in these tumors. To determine whether local DNA methylation was also altered in these BC samples, methylation of XIST, a X-linked gene known to be methylated in women, and GAPDH, a gene constitutively active and unmethylated, were analyzed by precipitation of methylated DNA using the methylCollector Ultra kit. As expected, methylation of XIST was observed in 100 % of both gDNA issued from NT and grade I-II BC tissues tested but lost in 3 out of 5



triple negative BC biopsies (Grade III) (Additional file 1: Figure S1). On the contrary, *GAPDH* was never found to be methylated in NT gDNA but was surprisingly frequently methylated in gDNA issued from BC samples (Additional file 1: Figure S1). Loss of global DNA methylation in several tissues (Fig. 2a 4 out 13 samples) and aberrant status of methylation of *XIST* and *GAPDH* (Additional file 1: Figure S1) strongly suggested that DNA methylation was deregulated in BC samples.

We next analyzed whether epigenetic regulation of the *GABARAPL1* might explain its specific down-regulation in BC. *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2* present CpG rich areas in their promoter (-800/+200) as predicted using the methPrimer software [27], so we analyzed the methylation status of these promoters using the methylCollector Ultra kit (Fig. 2b and c). A low methylation signal was observed in both *GABARAP* and *GABARAPL2* promoters (MC primers) both in tumors and NT tissues while primers designed in the 800 region of *GABARAPL1* (MC1) (Fig. 2c) revealed a strong signal of methylation in both NT and BC tissues. Regarding *GABARAPL1*, a low signal of unmethylation was also measured in NT samples but not in BC samples suggesting that hemi-methylation was lost in cancer cells ($p = 0.0024$) (Fig. 2c). To confirm the higher level of methylation in the *GABARAPL1* promoter in BC, the same experiment was repeated using primers (MC2) designed to detect the 5'-UTR region of this gene. Results obtained with MC2 primers showed that *GABARAPL1* was not or weakly methylated in NT samples but highly methylated in BC tissues ($p = 0.05$) (Fig. 2c). Pearson correlation analysis revealed that *GABARAP* or *GABARAPL2* expression was not correlated with methylation status ($r = -0.45$, $p = 0.12$ and $r = 0.36$, $p = 0.25$ Fig. 2d), while *GABARAPL1* expression was indeed correlated with the methylation status of the gene ($r = -0.58$, $p = 0.03$ suggesting that methylation of the *GABARAPL1* promoter may explain the downregulation of *GABARAPL1* expression in BC (Fig. 2d).

In order to characterize the pathway allowing epigenetic modifications to control *GABARAP* family expression, we first analyzed *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2* mRNA levels using qRT-PCR in MCF-7 and MDA-MB-453 (BC cell lines) and MCF-10A (Breast immortalized but non tumoral cell line) cell lines (Fig. 3a). Both *GABARAP* ($p = 0.039$), *GABARAPL1* ($p = 0.013$) and *GABARAPL2* ($p = 0.039$) expression were decreased in MCF-7 compared to MCF-10A but while the loss of *GABARAP* or *GABARAPL2* expression was weak (0.5-2 fold), *GABARAPL1* expression was about 100-fold lower in MCF-7 compared to MCF-10A (Fig. 3a). Similar results were obtained for *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2* in MDA-MB-453 cells but *GABARAP* did not show any significant differences in this cell line (Fig. 3a). Methylation of the *GABARAP* family promoters was then

assessed using the MethylCollector kit in both MCF-7 and MDA-MB-453 cell lines presenting a low expression of *GABARAPL1*. First, a signal of methylation of *GABARAP* promoter was observed in MCF-7 cells but not in MDA-MB-453 cells (Fig. 3b). Regarding *GABARAPL2* promoter, no methylation was detected in both cell lines. A high signal of methylation was detected in the *GABARAPL1* promoter in MCF-7 and MDA-MB-453 cells using MC1 primers confirming that the region of MC1 is highly frequently methylated. As expected *GABARAPL1* promoter methylation was lost in MCF-7 cells treated with 5-aza-CdR deoxycytidine (5-aza-CdR), a DNMTi (Fig. 3b). A high signal of methylation was also detected using MC2 primers in MCF-7 cells but not in MCF-10A cells suggesting, as observed before in human BC biopsies, that *GABARAPL1* methylation is predominantly observed in BC cell lines (Fig. 3c)

As local DNA methylation is frequently associated to histone deacetylation, the acetylation status of histone H3 (H3-ac) was analyzed by ChIP in MCF-7 and MDA-MB-453 cells previously treated or not with trichostatin A (TSA), an inhibitor of HDACs (Fig. 3d). ChIP analysis revealed that H3 acetylation was detected in the *GABARAP* promoter in MCF-7 cells but not in MDA-MB-453 cells. A very low level of H3 acetylation was also observed in *GABARAPL2* promoter in these both cell lines. These signals were increased following TSA treatment in MCF-7 and MDA-MB-453 cells. Similarly, no H3 acetylation signal could be detected in the *GABARAPL1* promoter of BC cells but this signal was increased after TSA treatment, particularly in the MDA-MB-453 cells (Fig. 3d).

All these data (Figs. 1, 2 and 3) suggest that *GABARAPL1* is the most regulated gene of the *GABARAP* family and that require promoter deacetylation and DNA methylation. Interestingly, both DNMT1, which predominantly catalyzes inheritance DNA methylation, and HDAC1 were detected on *GABARAPL1* promoter in MCF-7 cells using ChIP experiments (Fig. 3e).

We next asked whether 5-aza-CdR or TSA could restore *GABARAPL1* expression in BC cell lines. To do so, MCF-7 and MDA-MB-453 cells were treated with 5-aza-CdR or TSA and the levels of *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2* mRNA were measured using qRT-PCR (Fig. 4a) while protein levels were quantified by western blotting (Fig. 4b). All cells were also treated with MG-132, before protein extraction, to prevent the fast proteasomal degradation of *GABARAPL1* which has been previously reported [28]. First we observed a not significant increase of *GABARAP* mRNA ($p = 0.07$) but a significant increase of the corresponding protein *GABARAP* ($p = 0.007$ and $p = 0.02$) following TSA treatment in MCF-7 and MDA-MB-453 cells. Both *GABARAPL2* mRNA ($p = 0.05$ and $p = 0.05$ respectively) and *GABARAPL2* protein ($p = 0.045$ and $p = 0.0003$ respectively) were increased in MCF-7 and

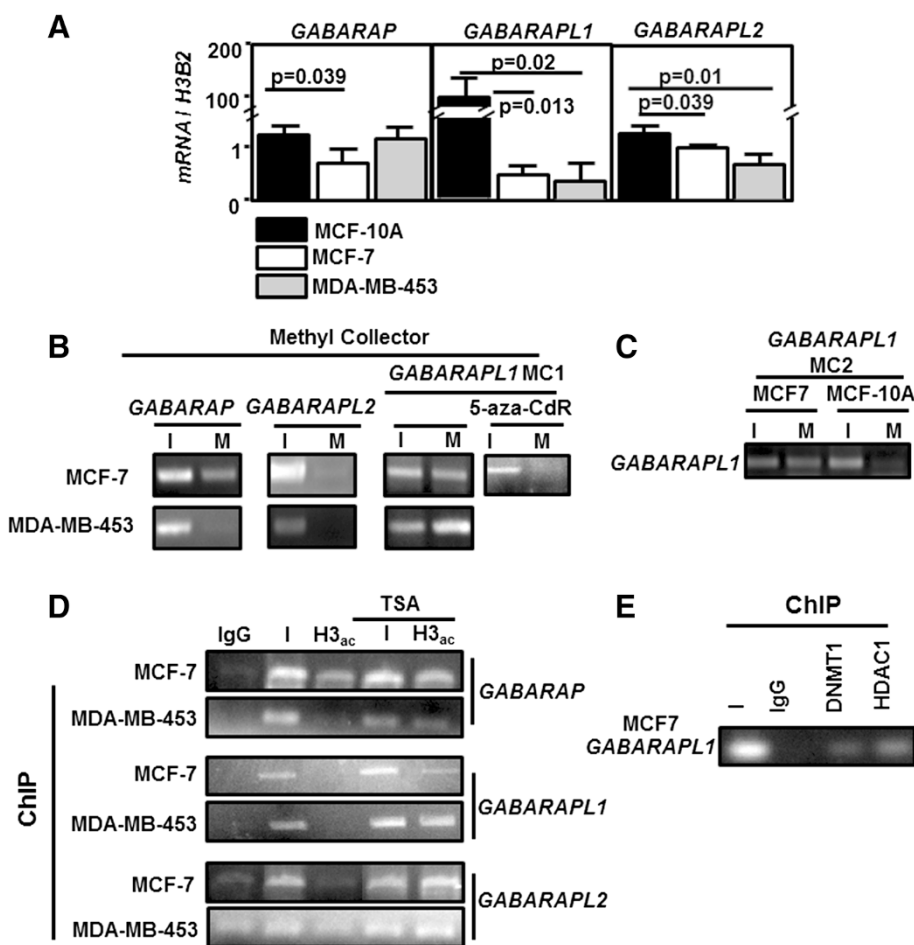


Fig. 3 Epigenetic modifications in *GABARAP* family gene promoters. **a** Quantification of *GABARAP*, *GABARAPL1*, *GABARAPL2* expression using qRT-PCR in BC MCF-7 and MDA-MB-453 cancer cells and MCF-10A immortalized cells. **b** and **c** *GABARAP* family gene methylation using methylCollector kit in MCF-7, MDA-MB-453 and MCF-10A cells. (I: input; M: methylated fraction). **d** Visualization of H3 deacetylation using ChIP experiment and anti-H3 acetylated (H3-ac) antibody in the *GABARAP* family gene in MCF-7 and MDA-MB-453 cells (I: input; IgG: negative control of IP). **e** Detection of DNMT1 and HDAC1 recruitment on *GABARAPL1* promoter using ChIP experiment and anti-DNMT1 or anti-HDAC1 antibody (I: input; IgG : negative control)

MDA-MB-453 cells treated with TSA. No significant effect of 5-aza-CdR could be observed on *GABARAP* and *GABARAPL2* expression (Fig. 4a). On the opposite, 5-aza-CdR treatment increased *GABARAPL1* mRNA level (about 2 fold) in both cell lines ($p = 0.004$ and $p < 0.0001$ respectively) while TSA treatment increased *GABARAPL1* expression of 10 to 25 fold (Fig. 4a). Moreover, *GABARAPL1* expression, which was undetectable in non treated MCF-7 cells or 5-aza-CdR-treated cells, was increased following TSA treatment (Fig. 4b). A weak and diffuse band signal corresponding to the *GABARAPL1* protein was also in over-exposed western-blotting using lysates of MDA-MB-453 cells treated with TSA, suggesting that *GABARAPL1* might also be slightly increased in these cells after TSA treatment.

Altogether these results confirm that *GABARAPL1* is the gene of the *GABARAP* family whose expression is the

most sensitive to epigenetic regulation in BC cell lines. Since 5-aza-CdR and TSA treatments restored *GABARAPL1* content, we next asked whether these compounds modulate autophagy and cell proliferation in MCF-7 cells (Additional file 2: Figure S2). Both an increase of LC3B-II (form associated to the autophagosomes) (Additional file 2: Figure S2A) and of cells with GFP-LC3 puncta (Additional file 2: Figure S2B) were observed in respectively 5-aza-CdR/ TSA treated cells and in GFP-LC3 transfected and TSA treated cells compared to control cells. Moreover, both an decrease of cell proliferation and clonogenicity were also observed in MCF-7 treated cells (Additional file 2: Figure S2C and D). These results suggest that restoration of *GABARAPL1* expression might be linked to these processes although some pleiotropic effects of 5-aza-CdR and TSA treatment could also be involved [29].

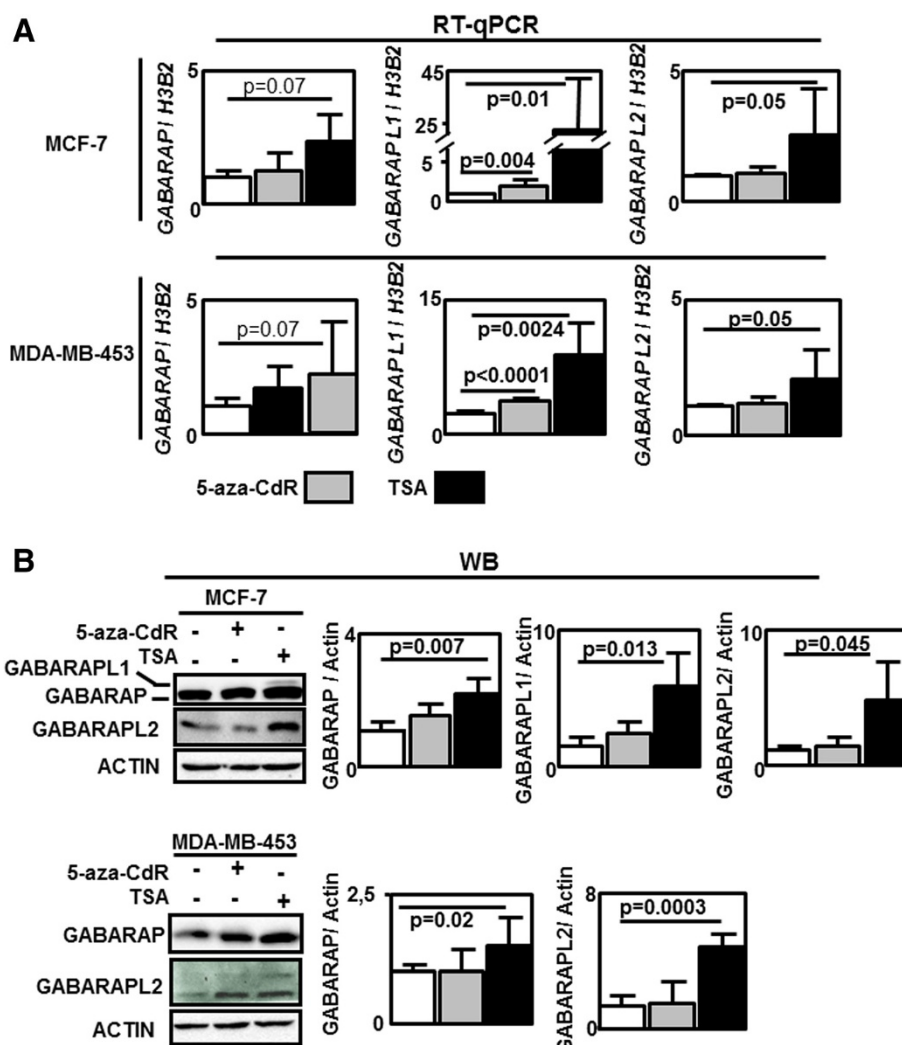


Fig. 4 Effects of epigenetic modulators on the *GABARAP* family gene expression. **a** Effects of 5-aza-deoxycytidine (5-aza-CdR) or trichostatin A (TSA) on *GABARAP* family gene expression using qRT-PCR analysis. **b** Effects of 5-aza-CdR or TSA on *GABARAP* family protein expression using WB (anti-GABARAP/GABARAPL1, anti-GABARAPL2 and anti-ACTIN antibodies) in cells previously treated with MG-132. Differences were quantified using a t-test

GABARAPL1 expression is regulated by CREB-1

Behind epigenetic modifications of the promoter, the second step of gene regulation is the recruitment of transcriptional factors (TF). Therefore, in order to characterize the mechanisms governing *GABARAPL1* expression in these cells, we cloned two fragments of the *GABARAPL1* promoter (-659/+241 and -336/+241) in the pGL3 luciferase reporter plasmid. As suggested by 3 different softwares (TESS <http://www.cbil.upenn.edu/tess>, Cister <http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml> and Patch <http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#-patch>) used to predict TF binding sites, several putative CRE (cAMP Response Element) elements were identified in *GABARAPL1* promoter (Fig. 5a). Indeed, following transfection of our constructions in MCF-7 cells, we observed a significant increase of luciferase signal in cells

transfected with the 336/+241-*GABARAPL1*-promoter-pGL3 plasmid compared to the empty pGL3 vector suggesting the presence of functional regulatory elements in this region. Moreover, luciferase activity was strongly increased when cells were transfected with the 659/+241-*GABARAPL1* promoter-pGL3 vector compared to the basal 336/+241-*GABARAPL1*-promoter-pGL3 vector suggesting that the region -659/-336 is also important for *GABARAPL1* regulation (Fig. 5b). Both treatment of MCF-7 cells with forskolin, a compound known to activate CREB-1 (CRE binding protein-1), or transfection with a plasmid expressing the CREB-1 protein significantly increased luciferase activity linked to the construction 659/+241-*GABARAPL1* promoter-pGL3, suggesting that CREB-1 is indeed involved in *GABARAPL1* expression (Fig. 5c). The increase of luciferase activity in cells

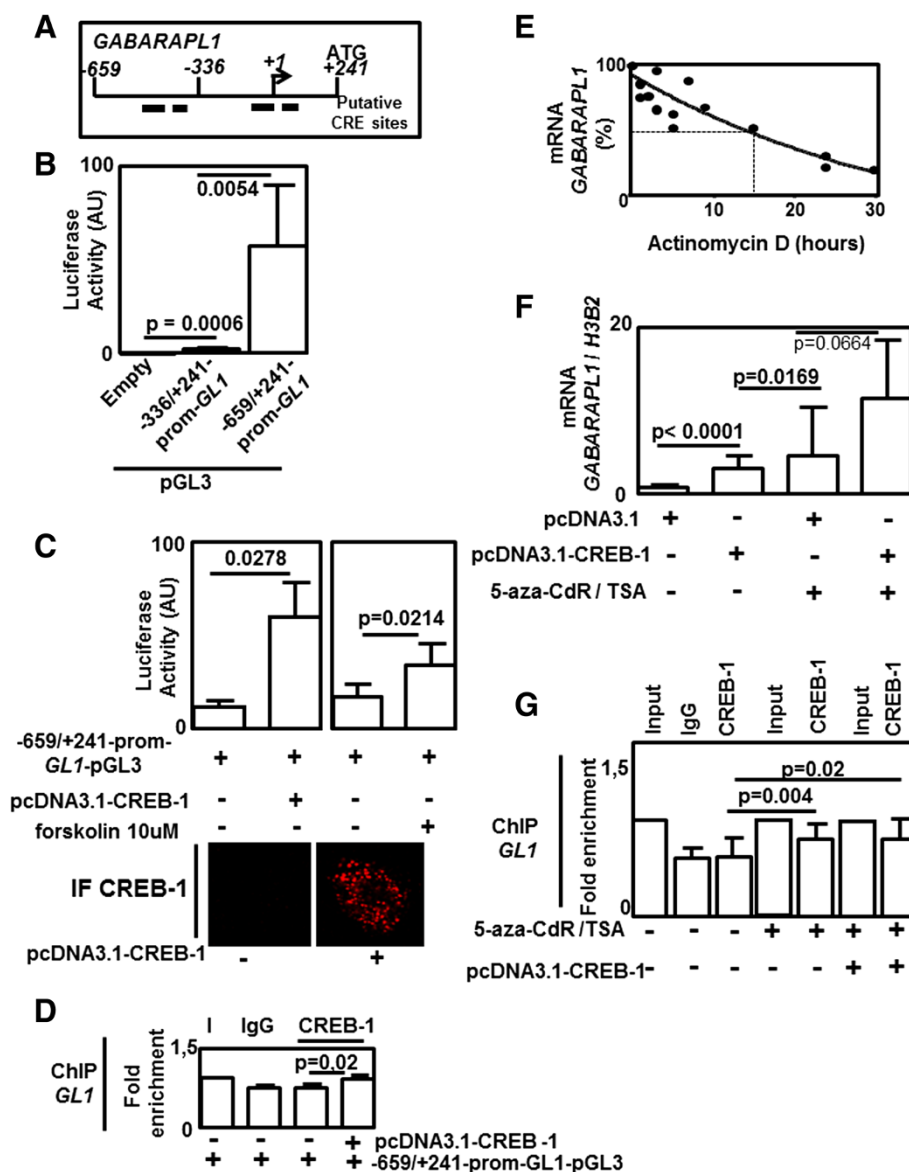


Fig. 5 *GABARAPL1* expression is controlled by CREB-1. **a** Scheme describing the position of primers used (in regard of the putative initial transcription site (+1) and putative CRE (CREB-1 response elements) sites in the *GABARAPL1* promoter). **b** and **c** Luciferase activity measured using a Luciferase assay System Kit in MCF-7 cells transfected with empty pGL3 plasmid, -336/+241-*GABARAPL1*-promoter-pGL3 plasmid, -659/+241-*GABARAPL1*-promoter-pGL3 plasmid, pCDNA3.1-CREB-1 or treated with (10 μ M) forskolin. **c** Bottom : expression of CREB-1 using IF in cells transfected or not with the pCDNA3.1-CREB-1 vector. **d** Recruitment of CREB-1 on -659/+241-*GABARAPL1*-promoter-pGL3 plasmid using ChIP experiment and anti-CREB-1 antibody in MCF-7 cells transfected with -659/+241-*GABARAPL1*-promoter-pGL3 and pCDNA3.1-CREB-1 plasmids (I: input; IgG: negative control of IP). **e** Half-life of *GABARAPL1* mRNA using qRT-PCR following Actinomycin D treatment in MCF-7 cells. **f** Effects of CREB-1 overexpression (following pCDNA3.1-CREB-1 plasmid transfection) and/or 5-aza-CdR/TSA treatment on *GABARAPL1* expression using qRT-PCR in MCF-7 cells. **g** Effects of CREB-1 overexpression (following pCDNA3.1-CREB-1 plasmid transfection) and/or 5-aza-CdR/TSA treatment on CREB-1 recruitment in *GABARAPL1* promoter using ChIP experiment and an anti-CREB-1 antibody (I: input; IgG: negative control). Differences were quantified using a t-tests. GL1: *GABARAPL1*

transfected with the pCDNA3.1-CREB-1 vector might be explained by the low level of endogenous CREB-1 in MCF-7 cells as observed in IF experiments (Fig. 5c) and ChIP experiment also confirmed the recruitment of CREB-1 on the -659/+241-*GABARAPL1*-promoter in spite of the presence of a high background noise that may be provoked by the presence of -659/+241-*GABARAPL1*-

promoter plasmid (Fig. 5d). We next asked whether endogenous *GABARAPL1* expression may be regulated by CREB-1. Treatment of MCF-7 cells with Actinomycin D revealed that the half-life of *GABARAPL1* mRNA was high (about 17 h) suggesting that regulation of *GABARAPL1* mRNA content is more dependent on transcription than mechanisms affecting mRNA stability (Fig. 5e)

[30, 31]. Moreover, overexpression of CREB-1 in MCF-7 cells significantly increased *GABARAPL1* expression but at a lower level than the ones observed in cells treated with 5-aza-CdR/TSA (Fig. 5f). Moreover, a non-significant ($p = 0.066$) further increase of *GABARAPL1* expression was observed in cells transfected with the CREB-1 plasmid and treated with 5-aza-CdR/TSA compared to cells with 5-aza-CdR/TSA treatment alone.

These data suggest that epigenetic modifications may be an initial predominant factor allowing the recruitment of CREB-1 on *GABARAPL1* promoter. These observations were partly confirmed by ChIP experiments showing an increase of CREB-1 recruitment on *GABARAPL1* promoter in MCF-7 cells previously treated with 5-aza-CdR/TSA. But no significant difference could be observed between 5-aza-CdR/TSA treated cells transfected or not with the vector encoding CREB-1 (Fig. 5g).

Discussion

While the role of autophagy in tumorigenesis is still controversial, it is currently admitted that autophagy is generally reduced in cancer cells. Whereas the origin of the autophagy disruption is still unknown, mutations or loss of heterozygosity-dependent autophagy gene silencing (*LC3*, *ATGs*, *UVRAG*, *BECN-1*) have been reported in many different cancers, such as colorectal, gastric carcinoma or breast cancers [32–36]. Besides mutations, epigenetic modifications frequently occur in cancers, such as global DNA hypomethylation and/or both local hypo and hypermethylations in specific loci [37–39]. Hypermethylation of five autophagy-related genes, *BECN-1*, *ATG16L2*, *ULK2*, *BNIP3* and a variant of *LC3A*, were previously reported respectively in BC, leukemia, astrocytoma, colorectal cancer and esophageal carcinoma and these data demonstrated that this hypermethylation was correlated to tumor grade [15–19]. Moreover, inhibition of the HMT EZH2 or G9a promotes autophagy in cancer cells while the use of HDACi gave contradictory results on autophagy levels in cancer cells [12, 40].

Despite a high homology between the different members of the GABARAP family (*GABARAPL1* shows 87 % identity with *GABARAP* and 61 % with *GABARAPL2*), these proteins are differentially expressed during development and in adult tissues (for review see [41]) and these proteins have been described to be involved in several molecular pathways, including receptor transport and autophagy. Previous studies revealed that *GABARAP* and *GABARAPL1* may have redundant functions in transport but experiments of invalidation/overexpression of *GABARAP* and *GABARAPL1* showed that both are required for autophagy [42, 43]. *GABARAPL1* expression has been described to be decreased in cancer cell lines. MCF-7 cells stably expressing exogenous Flag-*GABARAPL1*-6His presents a significantly reduced proliferation rate

compared to control cells [6]. Other studies described that a high expression of this gene is associated with a positive outcome in metastatic BC [5, 6] while a low expression of *GABARAPL1* was also associated with a poor outcome in kidney carcinoma patients [44]. Our results presented in this study confirmed these data by showing an inverse correlation between *GABARAPL1* expression and BC grade (Fig. 1). While *GABARAP* and *GABARAPL2* expression are also reduced in the tumor samples, this decrease was not significant. Similar differences were observed between non tumoral MCF-10A cells and MCF-7 BC cells since we showed a significant decrease of *GABARAP* and *GABARAPL2* expression in MCF-7 cells but the highest decrease was observed for *GABARAPL1*. Based on previous data reporting an epigenetic regulation of *BECN-1* in BC and our data showing a deregulation of DNA methylation in our BC samples (Fig. 2a, and Additional file 1: Figure S1), we hypothesized that the loss of *GABARAPL1* expression in BC might be linked to epigenetic modifications. Indeed, DNA methylation dependent gene silencing is frequent in BC and is highly related to BC tumor genotypes (e.g. hypermethylation of *ESR1* in ER α negative patients), and may be essential to determine the good treatment [45]. We report here that the *GABARAPL1* gene is highly methylated in both 600 (MC1) and +200 (MC2) promoter regions but the 5'-UTR +200 region presents the more significant difference between non tumoral tissues/cells promoter regions and tumoral/cancer cells since this region is poorly methylated in normal tissue and frequently methylated in tumors (Fig. 2). As described in previous studies, a correlation between local DNA methylation and histone modifications is frequently observed in epigenetic-mediated gene silencing [46, 47]. Our results confirm these observations, since we observed that the promoter of *GABARAPL1* presented a high level of methylated DNA and deacetylated histone H3 (Fig. 3). On the other hand, DNA methylation seemed poorly involved in *GABARAP* and *GABARAPL2* expression while the inhibition of HDACs by TSA increased H3 acetylation and increased *GABARAP* and *GABARAPL2* expression (Figs. 3 and 4).

Since the control of transcription factor accessibility in the region close to the transcription initiation site is often crucial for gene expression, we wondered whether it might be important for the regulation of *GABARAPL1* expression. According to transcription binding site prediction softwares, our data indeed revealed that *GABARAPL1* expression is controlled by CREB-1 and that inhibition of epigenetic repressive marks increased CREB-1-recruitment on the *GABARAPL1* promoter. Since CREB-1 has been previously involved in the regulation of autophagy, the role of this transcriptional factor may be crucial in this process. Indeed, neuron protection mediated by CREB-1 activation and associated with an increase of *BECN-1* and *LC3*

expression, was observed following rapamycin administration in ischemic neonatal rats [48]. On the opposite, CREB-1 activation together with mTOR inhibitors has also been described to potentiate chemotherapies in renal cancers [49]. Nevertheless, the mechanism by which CREB-1 can regulate autophagy and pro-survival signals in cancer cells will require further studies.

Conclusion

The current use of epigenetic drugs in clinical trials provides new options for personalized adjuvant therapies in cancers. Indeed, HDACi, such as Entinostat or valproic acid efficiently increase ER α expression in ER-BC tumors and considerably improve the efficiency of anti-estrogen signaling therapies [50, 51]. 5-aza-CdR treatment has also been previously reported to increase autophagy by inducing LC3B-II in myeloid cells and myeloid cells resistant to 5-aza-CdR presented an increase of basal autophagy [52]. An increase of GABARAP family protein expression, following 5-aza-CdR/TSA treatment, might at least partly explain this increase of autophagy levels. Indeed, GABARAP/GABARAPL1 overexpression in BC has been described to decrease cell proliferation and tumorigenesis in nude mice [53, 54]. All these data strongly support the idea that autophagy regulation may be a focal point for the design of combined anti-cancer therapies in the future. Mahalingam *et al.* recently proposed the evaluation of a combination of HDACi (vorinostat) and autophagy inhibitor (hydroxychloroquine) in a phase I study in patients with solid tumors [55]. However, identification of the molecular mechanisms governing gene silencing in autophagy impairment in cancer will definitely help to develop future specific drugs, and decrease the important side effects. Indeed, while DNMTi efficiently restore ER α or *BECN-1* expression in methylated tumors, these compounds also reduce global DNA methylation and local methylation [56]. DNMTi also strongly induce metalloproteinase expression in lymphoma and pancreatic cancers suggesting an increase of metastatic potential [57]. Similarly, urokinase, a marker of invasiveness associated with the most aggressive BC and with prostate cancers is increased after DNMTi treatment [58, 59]. In agreement with previous studies on different autophagy related-genes, our work demonstrated for the first time that the *GABARAP* family genes, and particularly *GABARAPL1*, are regulated by epigenetic modifications in BC and that epigenetic inhibitors might be used in combination with classical anti-chemotherapeutic drugs for futures anti-cancer therapies.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. *XIST* and *GAPDH* methylation status in BC. *XIST* and *GAPDH* methylation was quantified using methylCollector kit. NT: non tumoral, ER +/-: status of expression of estrogen receptor α ,

PR+/-: status of expression of progesterone receptor, HER+/-: status of expression of Human epidermal growth factor receptor. White : absence of signal ; black : signal of methylation. (TIFF 77 kb)

Additional file 2: Figure S2. Effects of 5-aza-CdR/TSA treatment on autophagy and cell proliferation. Increase of both cytosolic LC3-I and autophagosome associated LC3-II forms detected by western blotting using lysates of MCF-7 cells treated with 5-aza-CdR/TSA (antibody anti-LC3: L8918, Sigma-Aldrich). (B) Increase of the number of cells presenting vesicles in GFP-LC3 positive MCF-7 cells transfected with GFP-LC3 and treated with 5-aza-CdR or TSA. (C) A decrease of cell proliferation was observed in MCF-7 cells treated with 5-aza-CdR/TSA using the crystal violet/acid acetic method as previously described [61]. (D) A decrease of clonogenicity was observed in MCF-7 treated with 5-aza-CdR/TSA using the crystal violet method as previously described [62]. (TIFF 122 kb)

Abbreviations

ATG: Autophagy-related protein; BECN-1: BECLIN-1; BC: Breast Cancer; ChIP: Chromatin immunoprecipitation; CREB-1: cAMP response element binding protein; DNMT: DNA methyl transferase; DNMTi: DNMT inhibitor; ER: Estrogen receptor; GABARAP: GABA_A-receptor associated protein; GABARAPL1/GEC1: GABARAP like protein 1/Glandular Epithelial Cells 1; GL1: GABARAPL1; GABARAPL2/GATE-16: GABARAP like protein 2/golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; HDAC: Histone deacetylase; HDACi: HDAC inhibitor; HDM: Histone demethylase; HER: Human epidermal growth factor; hMOF: Human ortholog of drosophila males absent in the first; HMT: Histone methyl transferase; IF: Immunofluorescence; MAP-LC3: Microtubule associated protein-Light chain 3; PBS: Phosphate buffer saline; PBS-T: PBS-triton-x100; PFA: Paraformaldehyde; PR: Progesterone receptor; PVDF: Polyvinylidene difluoride; SDS: Sodium dodecylsulfate; TBS-T: Tris buffer saline tween 20; TSA: Trichostatin A; 5aza-CdR: 5-aza-deoxycytidine.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

EH, ACT, TG, VP carried out the molecular studies. FM and MPA participated in the selection of samples and their validation. EH and MBG wrote the manuscript. AF, PA, GD and RDM helped draft the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript

Acknowledgements

We thank Dr. Vincent Coulon (Montpellier, France) for providing the pCDNA3.1-CREB-1 plasmid [60]. This work was supported by the Université de Franche-Comt , and funding from BQR Jeunes chercheurs of Université de Franche-Comt , Minist re de l'Enseignement Sup rieur de la Recherche (MESR), R gion de Franche-Comt 2013 and Ligue Contre le Cancer (#007. Y-2014). ACT was supported by a fellowship from R gion de Franche-Comt .

Author details

¹Universit  de Franche-Comt , Laboratoire de Biochimie, EA3922 Estrog nes, Expression G nique et Pathologies du Syst me Nerveux Central , SFR IBCT FED4234, UFR Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besan on Cedex, France. ²Department of Pathology, University Hospital Jean-Minjoz, 25030 Besan on, France.

Received: 5 May 2015 Accepted: 9 October 2015

Published online: 17 October 2015

References

- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature*. 2010;466(7302):68–76.
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015;34(7):856–80.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*. 2004;6(12):1221–8.

4. Yu L, Gu C, Zhong D, Shi L, Kong Y, Zhou Z, et al. Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance. *Cancer Lett.* 2014;355(1):34–45.
5. 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(2):216–9.
6. Berthier A, Seguin S, Sascio AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of *gabarap1* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2010;102(6):1024–31.
7. Byler S, Goldgar S, Heerboth S, Leary M, Housman G, Moulton K, et al. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res.* 2014;34(3):1071–7.
8. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008;659(1–2):40–8.
9. Sharma P, Stecklein SR, Kimler BF, Sethi G, Petroff BK, Phillips TA, et al. The prognostic value of promoter methylation in early stage triple negative breast cancer. *J Cancer Ther Res.* 2014;3(2):1–11.
10. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):87–95.
11. Fullgrave J, Lynch-Day MA, Heldring N, Li W, Struijk RB, Ma Q, et al. The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature.* 2013;500(7463):468–71.
12. Oh M, Choi IK, Kwon HJ. Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;369(4):1179–83.
13. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* 2010;29(5):969–80.
14. Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, Diaz-Meco MT, Moscat J, Jiang J, et al. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS One.* 2013;8(9):e76016.
15. 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(40):4397–408.
16. Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, Wang L, Clark RE, Dallol A, et al. A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Mol Cancer.* 2010;9:44.
17. Li Z, Chen B, Wu Y, Jin F, Xia Y, Liu X. Genetic and epigenetic silencing of the *beclin 1* gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer.* 2010;10:98.
18. Shukla S, Patric IR, Patil V, Shwetha SD, Hegde AS, Chandramouli BA, et al. Methylation silencing of *ULK2*, an autophagy gene, is essential for astrocyte transformation and tumor growth. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22306–18.
19. Swiderek E, Kalas W, Wysokinska E, Pawlak A, Rak J, Strzadala L. The interplay between epigenetic silencing, oncogenic KRas and HIF-1 regulatory pathways in control of *BNIP3* expression in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441(4):707–12.
20. Pernodet N, Hermetet F, Adami P, Vejux A, Descotes F, Borg C, et al. High expression of *QSOX1* reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012;14(5):R136.
21. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365–86.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
23. Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtkiskova A, Houstek J, Simonnet H, et al. A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis.* 2005;26(3):531–9.
24. Claude-Taupin A, Boyer-Guittaut M, Delage-Mourroux R, Hervouet E. Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for breast cancer therapies. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:487–509.
25. Hon GC, Hawkins RD, Caballero OL, Lo C, Lister R, Pelizzola M, et al. Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res.* 2012;22(2):246–58.
26. Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20 h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(1):65–70.
27. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002;18(11):1427–31.
28. Seguin-Py S, Lucchi G, Croizier S, Chakrama FZ, Despouy G, Le Grand JN, et al. Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein. *Biochimie.* 2012;94(3):748–58.
29. Zou CF, Jia L, Jin H, Yao M, Zhao N, Huan J, et al. Re-expression of *ARHI* (*DIRAS3*) induces autophagy in breast cancer cells and enhances the inhibitory effect of paclitaxel. *BMC Cancer.* 2011;11:22.
30. Mahmoud L, Al-Enezi F, Al-Saif M, Warsy A, Khabar KS, Hitti EG. Sustained stabilization of Interleukin-8 mRNA in human macrophages. *RNA Biol.* 2014;11(2):124–33.
31. Sharova LV, Sharov AA, Nedorezov T, Piao Y, Shaik N, Ko MS. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.* 2009;16(1):45–58.
32. Gao X, Zacharek A, Salkowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, et al. Loss of heterozygosity of the *BRCA1* and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1995;55(5):1002–5.
33. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9B* and *ATG12* in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol.* 2009;217(5):702–6.
34. Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH, Yoo NJ. Frameshift mutation of *UVRAG*, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2008;39(7):1059–63.
35. Russell SE, Hickey GI, Lowry WS, White P, Atkinson RJ. Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene.* 1990;5(10):1581–3.
36. Saito H, Inazawa J, Saito S, Kasumi F, Koi S, Sagae S, et al. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Res.* 1993;53(14):3382–5.
37. Hervouet E, Hulin P, Vallette FM, Cartron PF. Proximity ligation in situ assay for monitoring the global DNA methylation in cells. *BMC Biotechnol.* 2011;11:31.
38. Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, et al. Disruption of *Dnmt1/PCNA/UHRF1* interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS One.* 2010;5(6):e11333.
39. Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* 2010;1:e8.
40. He G, Wang Y, Pang X, Zhang B. Inhibition of autophagy induced by TSA sensitizes colon cancer cell to radiation. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1003–11.
41. Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, et al. GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy.* 2011;7(10):1098–107.
42. Cook JL, Re RN, DeHaro DL, Abadie JM, Peters M, Alam J. The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res.* 2008;102(12):1539–47.
43. 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(2):639–48.
44. 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(5):2043–8.
45. Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics.* 2013;8(3):237–45.
46. Ali MW, Cacan E, Liu Y, Pierce JY, Creasman WT, Murph HM, et al. Transcriptional suppression, DNA methylation, and histone deacetylation of the regulator of G-protein signaling 10 (*RGSI0*) gene in ovarian cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(3):e60185.
47. Cartron PF, Blanquart C, Hervouet E, Gregoire M, Vallette FM. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the *NY-ESO1* gene expression. *Mol Oncol.* 2012;7(3):452–63.
48. Carloni S, Girelli S, Scopa C, Buonocore G, Longini M, Balduini W. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy.* 2010;6(3):366–77.
49. Wang Y, Hu Z, Liu Z, Chen R, Peng H, Guo J, et al. MTOR inhibition attenuates DNA damage and apoptosis through autophagy-mediated suppression of CREB1. *Autophagy.* 2013;9(12):2069–86.

50. Fortunati N, Bertino S, Costantino L, De Bortoli M, Compagnone A, Bandino A, et al. Valproic acid restores ER alpha and antiestrogen sensitivity to ER alpha-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;314(1):17–22.
51. Sabnis GJ, Goloubeva O, Chumsri S, Nguyen N, Sukumar S, Brodie AM. Functional activation of the estrogen receptor-alpha and aromatase by the HDAC inhibitor entinostat sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Res.* 2011;71(5):1893–903.
52. Cluzeau T, Robert G, Puissant A, Jean-Michel K, Cassuto JP, Raynaud S, et al. Azacitidine-resistant SKM1 myeloid cells are defective for AZA-induced mitochondrial apoptosis and autophagy. *Cell Cycle.* 2011;10(14):2339–43.
53. Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, et al. Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(2):394–400.
54. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672–6.
55. Mahalingam D, Mita M, Sarantopoulos J, Wood L, Amaravadi RK, Davis LE, et al. Combined autophagy and HDAC inhibition: a phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors. *Autophagy.* 2014;10(8):1403–14.
56. Cheray M, Pacaud R, Nadaradjane A, Vallette FM, Cartron PF. Specific inhibition of one DNMT1-including complex influences tumor initiation and progression. *Clin Epigenetics.* 2013;5(1):9.
57. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(4):327–30.
58. Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia.* 2008;10(3):266–78.
59. Pakneshan P, Xing RH, Rabbani SA. Methylation status of uPA promoter as a molecular mechanism regulating prostate cancer invasion and growth in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2003;17(9):1081–8.
60. Coulon V, Chebli K, Cavelier P, Blanchard JM. A novel mouse c-fos intronic promoter that responds to CREB and AP-1 is developmentally regulated in vivo. *PLoS One.* 2010;5(6):e11235.
61. Arrigo AP, Firdaus WJ, Mellier G, Moulin M, Paul C, Diaz-Iatoud C, et al. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods.* 2005;35(2):126–38.
62. Hervouet E, Debieu E, Campion L, Charbord J, Menanteau J, Vallette FM, et al. Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3519–29.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3. Etude du rôle de la protéine autophagique ATG9A dans les cancers du sein

Les résultats présentés dans la **Publication I** ont montré que l'expression de *GABARAPL1* est diminuée en fonction du grade du cancer du sein et que cette diminution peut être expliquée par des modifications épigénétiques chez ces mêmes patientes. Ces résultats nous ont amenés à nous demander si l'expression d'autres gènes de l'autophagie pouvait être régulée, de manière similaire, dans les cancers du sein.

Nous avons ainsi sélectionné six gènes de l'autophagie (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* et *SQSTM1/P62*) en fonction de leur importance dans le processus autophagique et/ou sur la base de données déjà disponibles dans la bibliographie indiquant une modification de leur expression dans les cancers. Comme cela a été décrit dans l'introduction (**paragraphe II**), *ATG9A* et *ATG9B* sont deux protéines impliquées dans la formation des autophagosomes (Yamada *et al*, 2005). Nous avons aussi souhaité aussi quantifier l'expression de *LC3B* car la protéine codée par ce gène est impliquée à la fois dans la formation des autophagosomes mais également dans le recrutement de substrats à dégrader, comme décrit dans l'introduction (**paragraphe II**). C'est le cas également pour *SQSTM1/P62*, qui joue un rôle dans le recrutement de substrats à dégrader (Introduction, **paragraphe II**) au cours de l'autophagie sélective. L'expression de *BECLIN1*, quant à elle, a été analysée car des études antérieures ont montré que son expression est réduite dans les cancers du sein (Aita *et al*, 1999; Li *et al*, 2010; Wu *et al*, 2012). Pour finir, nous avons choisi d'étudier l'expression de *NIX* dans notre cohorte car cette protéine joue un rôle dans l'induction de la mitophagie (Schweers *et al*, 2007) et son expression a déjà été analysée dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein, mais sans montrer de corrélation entre son expression et le grade cancéreux (Sowter *et al*, 2003).

La quantification de l'expression de ces six gènes de l'autophagie dans une cohorte de 47 patientes atteintes de cancer du sein a été réalisée dans les échantillons de tissus cancéreux puis comparée au tissu sain adjacent provenant de la même tumeur. Cette analyse a montré une baisse, mais non significative, de l'expression de *BECLIN1* dans les tissus cancéreux, comparée au tissu sain adjacent, de patientes atteintes de cancer du sein HER-2 et triple négatif, comparé aux patientes de type luminal A et B. Nous avons également observé que

l'expression de *NIX* est augmentée, mais de manière non significative, dans les sous-groupes de cancer du sein présentant une surexpression d'HER-2 (luminal B et HER-2). La quantification de *SQSTM1/P62* et *LC3B* a montré une diminution, mais non significative, de leur expression dans les échantillons cancéreux comparé au tissu sain adjacent, chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif. L'expression d'*ATG9B* semble également être diminuée dans les biopsies de tissu cancéreux comparé au tissu sain adjacent chez les patientes de type HER-2.

La quantification de l'expression des gènes *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *SQSTM1/P62* et *LC3B* a donc montré une faible variation non significative d'expression entre le tissu cancéreux et le tissu sain adjacent (médiane ratio tumeur/sain < 5,7), comparée à l'expression d'*ATG9A*. En effet, l'expression de l'ARNm d'*ATG9A* est augmentée d'une manière bien plus importante (médiane ratio tumeur/sain = 119 ; 11,84 et 64,05 pour les cancers du sein de type luminal A, luminal B et triple négatif, respectivement) et diminuée dans les cancers du sein de type HER-2 (médiane ratio tumeur/sain = 0,12). Cependant, nous n'avons pas pu montrer de différence d'expression d'*ATG9A* significative dans les tissus cancéreux de type luminal A, luminal B et triple négatif, comparés aux tissus sains adjacents provenant de la même patiente. Dans le but de confirmer ou d'infirmer cette tendance, nous avons augmenté la taille de notre cohorte à 80 patientes et nous avons alors pu montrer une augmentation significative de l'expression d'*ATG9A* dans les tissus de patientes atteintes de cancer du sein triple négatif, comparée au tissu sain adjacent à la tumeur. De plus, une analyse des données de survie de 255 patientes triple négatives à l'aide de l'outil « *KM plotter* », une base de données en ligne mettant à disposition les données d'expression de plus de 50 000 gènes et la survie de patients atteints de cancer du sein, de l'ovaire, du poumon ou de l'estomac, a permis de montrer que les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif présentant une forte expression d'*ATG9A*, ont une survie sans rechute significativement réduite comparée aux patientes exprimant un faible taux d'*ATG9A* (Györfy *et al*, 2010).

3.1 Rôle d'ATG9A dans la lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-436

La protéine ATG9A étant impliquée dans l'induction du processus autophagique, nous avons souhaité caractériser son rôle dans la lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif MDA-MB-436. Pour cela, nous avons mis au point deux modèles d'extinction de l'expression d'ATG9A dans cette lignée: 1) à l'aide de l'expression stable de sh-ARN ciblant la partie 5'

de l'ARNm d'*ATG9A* (**Figure 18A**) ou, 2) de la technique CRISPR-Cas9 en utilisant un ARN guide ciblant 19 nucléotides au niveau de l'exon 5 du gène *ATG9A* (**Figure 18B**).

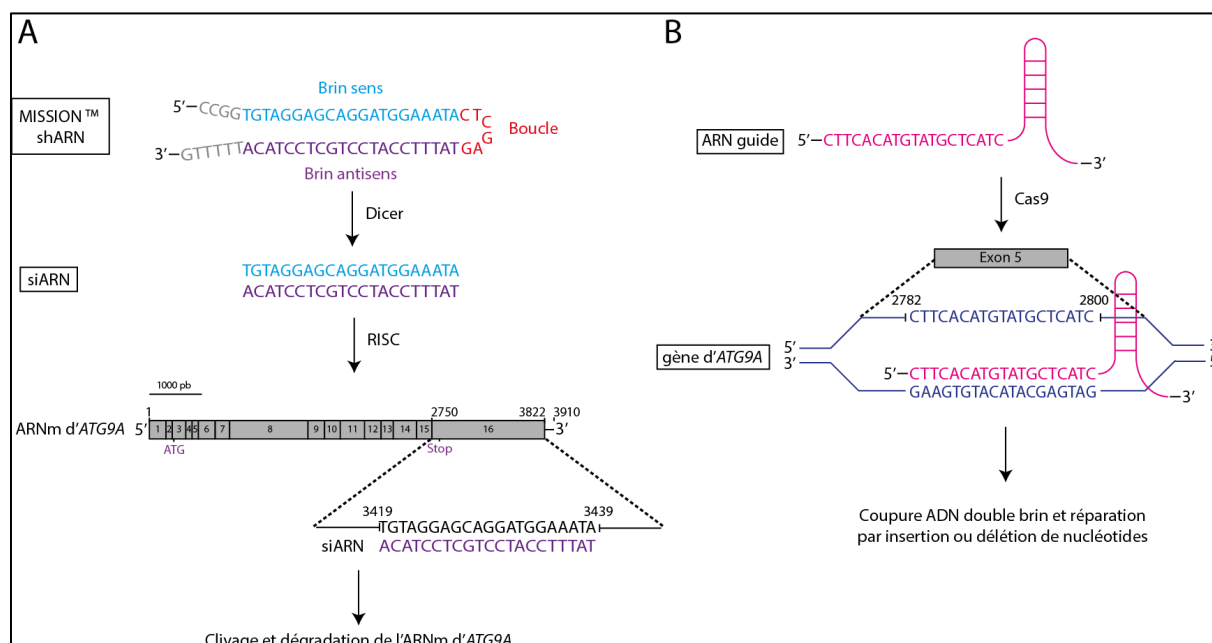


Figure 18 : Séquences des sh-ARN et ARN guide utilisées pour nos modèles d'extinction de l'expression d'*ATG9A* par sh-ARN et la technique CRISPR-Cas9, respectivement. (A) Le plasmide Mission™ sh-RNA (*Sigma*) utilisé pour l'extinction de l'expression d'*ATG9A* est clivé par Dicer pour obtenir un siRNA. Le siRNA est pris en charge par le complexe RISC (*RNAi-induced silencing complex*) pour permettre sa liaison au niveau de l'ARNm d'*ATG9A* (entre les nucléotides 3419 et 3439) et permettre ensuite son clivage et sa dégradation pour inhiber son expression. **(B)** La séquence d'ARN guide utilisée cible le gène d'*ATG9A* entre les nucléotides 2782 et 2800. L'endonuclease Cas9 induit alors une coupure d'ADN double brin au niveau de cette séquence. L'insertion ou la délétion de nucléotides au niveau du site de cassure est réalisé par les mécanismes de réparation de l'ADN double brin, pouvant résulter à une modification du cadre de lecture et la survenue précoce d'un codon stop.

Nous avons ainsi montré que l'extinction d'*ATG9A* par sh-ARN dans les cellules MDA-MB-436 diminue significativement leurs capacités de prolifération et d'invasion *in vitro* et de croissance tumorale *in vivo*. Cependant, l'extinction d'*ATG9A* par la technique CRISPR-Cas9 ne nous a pas permis d'observer de différence significative pour ces mêmes phénotypes cancéreux, comparé aux clones contrôles. Le séquençage de nos clones CRISPR a mis en évidence qu'un ou deux nucléotides adénines avaient été insérés dans la séquence du gène *ATG9A*, au niveau de la séquence ciblée par l'ARN guide utilisé. Des études bioinformatiques ont mis en évidence que ces mutations pourraient conduire à la synthèse d'une protéine *ATG9A* tronquée de 68 ou 98 acides aminés, respectivement. Ces protéines possèderaient la même séquence qu'*ATG9A* jusqu'à l'acide aminé 63, puis présenteraient un décalage du cadre de lecture jusqu'à un codon stop en position 68 ou 98. La partie N-terminale d'*ATG9A* pourrait donc être impliquée dans la régulation des caractéristiques cancéreuses des cellules MDA-MB-436.

Afin de déterminer si l'extinction d'ATG9A a un effet sur le processus autophagique, nous avons analysé les niveaux de LC3B-II, la forme lipidée de LC3B qui est associée aux autophagosomes, ainsi que la présence de vésicules acides par marquage LysoTracker[®]. Nous avons ainsi montré que l'extinction d'*ATG9A* par la méthode sh-ARN ou CRISPR-Cas9 conduit à l'accumulation de LC3B-II et de vésicules acides dans les cellules, comparé aux cellules contrôle. Ces données suggèrent que la perte d'ATG9A dans les cellules MDA-MB-436 conduit à l'accumulation d'autophagosomes ne pouvant pas être éliminés par fusion avec des lysosomes, au vu de l'accumulation massive de vésicules acides dans nos clones n'exprimant pas ATG9A.

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

Publication II:

***ATG9A* is overexpressed in triple negative breast cancer and its *in vitro* extinction leads to the inhibition of pro-cancer phenotypes.**

Aurore Claude-Taupin, Leïla Fonderflick, Thierry Gauthier, Laura Mansi, Jean-René Pallandre, Christophe Borg, Valérie Perez, Franck Monnier, Marie-Paule Algros, Marc Vigneron, Régis Delage-Mourroux, Michaël Boyer-Guittaut and Eric Hervouet

**“ATG9A is overexpressed in triple negative breast cancer
and its *in vitro* extinction leads to the inhibition of pro-cancer phenotypes.”**

Aurore Claude-Taupin¹, Leïla Fonderflick¹, Thierry Gauthier², Laura Mansi³, Jean-René Pallandre², Christophe Borg³, Valérie Perez¹, Franck Monnier⁴, Marie-Paule Algros⁴, Marc Vigneron⁵, Régis Delage-Mourroux¹, Michaël Boyer-Guittaut¹ and Eric Hervouet^{1*}

¹ Univ. Bourgogne 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.

² INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche Comté, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 8 rue du Dr Girod, 25020 Besançon, France.

³ INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche Comté, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France.

⁴ Service de pathologie, CHRU de Besançon, 2, boulevard A.-Fleming, 25000 Besançon, France.

⁵ Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France.

***Corresponding author:** eric.hervouet@univ-fcomte.fr

Univ. Bourgogne 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.

Key words: autophagy, triple negative breast cancer, ATG9, LC3, lysosome, MDA-MB-436

Running Title: ATG9A role in autophagy and cancer development

ABBREVIATIONS

ATG, autophagy-related protein; BAFA1, Bafilomycin A1; BC, breast cancer; DMEM, dulbecco's minimum essential medium; EBSS, earle's balanced salt solution; ECM, extra cellular matrix; ER, estrogen receptor; FBS, fetal bovine serum; HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; HRP, horseradish peroxidase; IHC, Immunohistochemistry; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; mTORC1, mammalian target of rapamycin complexe 1; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; P62/SQSTM1, sequestosome 1; PBS, phosphate buffer saline; PBS-T, PBS triton-X-100; pN, lymph node status; pT, tumor size; PVDF, polyvinylidene difluoride; RT-qPCR, reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecylsulfate; SISH, silver *in situ* hybridization; TN, triple negative; TNBC, triple negative breast cancer

ABSTRACT

Even if earlier detection and targeted treatments has led to a significant decrease in mortality linked to breast cancer (BC), important issues will still need to be addressed in the future. One of them will be to find new triple negative breast cancer (TNBC) therapeutic strategies since none are currently efficiently targeting this subtype of BC. Amongst the potential pathways, numerous studies have reported the possibility to target the autophagy pathway. In our study, we identified *ATG9A*, a transmembrane protein involved in autophagosome formation, as a potential marker of TNBC. Indeed, we analyzed the expression of 6 autophagy genes (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *P62/SQSTM1*) by qRT-PCR in breast cancer tissues and compared their expression with healthy adjacent tissues and we showed an increase of *ATG9A* mRNA expression in TNBC samples from our breast cancer cohort. To corroborate these *in vivo* data, we have designed shRNA-driven inhibition of *ATG9A* in the MDA-MB-436 TNBC cell line in order to determine its role in the regulation of cancer phenotypes *in vitro* but also in xenografts models *in vivo*. We found that *ATG9A* inhibition led to an inhibition of *in vitro* and *in vivo* cancer features together with an accumulation of autophagosomes and lysosomes. On the opposite, when we designed CRISPR-driven inhibition of *ATG9A* in the MDA-MB-436 cell line, we also observed an accumulation of autophagosome or lysosome but did not inhibit *in vitro* cell proliferation or *in vivo* tumorigenesis in nude mice. This difference of cancer phenotypes could be linked to the expression of a short cytosolic N-terminus fragment of *ATG9A* still present in our CRISPR clones. Our results revealed that the localization of *ATG9A* in membranes is essential for its function in cancer but that the cytosolic N-terminus fragment is sufficient to regulate the autophagy process. This study showed, for the first time, that *ATG9A* could be considered as a new marker of TNBC and might be targeted in the future to develop new specific TNBC therapies.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is one of the three most commonly diagnosed cancers in women and 246,660 new cases of female invasive BC are expected to be diagnosed in 2016 in the United States (1). Thanks to earlier detection and targeted treatments, mortality has declined about 30 % over the past two decades (2). Nevertheless, the American Cancer Society estimates 40,450 deaths linked to breast cancers in the United States in 2016 (1), rendering it a major health problem. The triple-negative breast cancers (TNBC) represents approximately 10 % of BC and are defined as tumors lacking estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) expression (ER⁻, PR⁻, HER2⁻). TNBC present a poor prognosis mainly because of the limited treatment options. In fact, no specific therapy targeting TNBC is currently available and cytotoxic chemotherapy still remains the current treatment strategy (3).

During the course of development of new therapeutic options for the treatment of BC, numerous studies have reported the possibility to target the autophagy pathway. For example, autophagy inhibition has been shown to improve chemotherapy efficiency in TNBC presenting high levels of LC3B, the main protein marker of autophagy (4), and to enhance the therapeutic response in both anthracycline-sensitive and resistant TNBC cells (5). Autophagy has also been proposed to protect TNBC cells from damaged mitochondria accumulation induced by chemotherapies (6). Furthermore, a phase II clinical trial is underway to determine the efficiency and safety of chloroquine, a lysosomal inhibitor, in combination with taxane chemotherapies, in advanced and metastatic BC patients, who have previously failed anthracycline therapy (NCT01446016, *clinicaltrials.gov*).

Autophagy is a cellular process involved in the maintenance of cell homeostasis and cell survival by inducing the degradation and/or the recycling of intracellular components such as protein aggregates or organelles (*e.g.* damaged mitochondria). This process is mediated by more than 30 core ATG (AuTophagy-related) proteins and characterized by the formation of a double-membrane structure, called phagophore, which elongates and closes to generate an autophagosome. The autophagosome, which engulfs cytosolic material as well as organelles, later fuses with a lysosome to form an autophagolysosome, leading to the degradation of its content by lysosomal proteases (for a review, see (7)). The initiation and elongation of this structure requires several ATG proteins, one of them being the ATG9 protein. Two isoforms of ATG9, A and B, are expressed in mammals and these proteins are the only transmembrane ATG proteins identified so far. ATG9A is ubiquitously expressed while ATG9B is enriched in placenta and the pituitary gland, suggesting that ATG9B may

play a specific role during embryogenesis (8). While the specific function of these two isoforms still remains unclear, it has been proposed that ATG9B may complement ATG9A role during autophagy. ATG9A presents six conserved transmembrane domains with both N and C-terminus localized on the cytosolic side of the vesicle. ATG9A intracellular trafficking between the endosome or Golgi and the elongating phagophore is essential for autophagosome formation and ATG9A has therefore been proposed as the main candidate for delivering lipids to growing phagophores (9). Indeed, under nutrient-rich conditions, ATG9A is found in the *trans*-Golgi network, recycling and late endosomal compartments (9–12) but upon amino-acid starvation, it is relocalized towards the autophagosome initiation site, where it dynamically interacts with phagophores and autophagosomes without being incorporated into them (10).

ATG9A deregulation has already been linked to cancer since ATG9A protein overexpression has been associated with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma (13) whereas ATG9A inhibition was associated to the apparition of trastuzumab resistance in HER2⁺ BC cells (14). Furthermore, a recent study reported a decrease of *ATG9A* mRNA expression in breast invasive ductal carcinomas, compared to adjacent normal tissues, and this decrease of expression was linked with increased promoter methylation (15). More interestingly, the authors also demonstrated a significant decrease of *ATG9A* mRNA expression in HER2⁺ BC but, to our knowledge, no published study has already characterized the expression and the role of ATG9A in TNBC.

In our study, we analyzed the expression of six *ATG* genes (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *SQSTM1/P62*) using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in BC tissues and compared their expression with healthy adjacent tissues. Our data clearly demonstrated that only *ATG9A* mRNA levels were significantly higher in TNBC tissues compared to healthy adjacent tissues. We then inhibited *ATG9A* expression in the TNBC cell line MDA-MB-436 using specific sh-RNA and found that *ATG9A* inhibition led to an inhibition of *in vitro* and *in vivo* cancer features, proliferation, invasion and tumor growth, together with an accumulation of autophagosomes and lysosomes. On the opposite, the inhibition of *ATG9A* expression using a CRISPR-Cas9 strategy in MDA-MB-436 cells also led to an accumulation of autophagosomes or lysosomes but did not inhibit *in vitro* cell proliferation or *in vivo* tumorigenesis in nude mice. The analysis of the mutations created in the *ATG9A* gene in our CRISPR clones showed that these cells could still produce a truncated form of ATG9A, including the 63 first amino-acids of the wild-type protein, but which will no longer be a transmembrane protein. Our hypothesis is that the localization of ATG9A into membranes is

essential for its function in cancer but that the short cytosolic N-terminus fragment produced in the CRISPR clones is sufficient to regulate the autophagy process.

MATERIALS AND METHODS

Ethic statement

Human samples were collected according to French laws and the recommendations of the French National Committee of Ethics. Indeed, this study has been approved by the scientific committee of “the tumorothèque régionale de Franche-Comté BB-0033-00024”. The samples and the medical history of patients were encoded to protect patient confidentiality and used under protocols approved by the recommendations of the French national Committee of Ethics. All human samples were collected by Pr. Séverine Valmary-Degano (Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France) at the “Tumorothèque régionale de Franche-Comté BB-0033-00024”. Collection of samples and their use (AC-2010-1163) for further studies have been approved by the French “Ministère de la Recherche” and by the CPP EST II. We obtained all necessary consents from any patients involved in the study.

Tumor samples

The different patients were treated in two medical centers (“Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon” and “Centre Hospitalier Régional de Belfort-Montbéliard”) and the samples collected were included by the “Tumorothèque Régionale de Franche-Comté” between January 2007 and September 2014 (n = 80). The median age is 58 years (range 26-85) and patients were selected according to their BC subtype at the time of diagnosis. Breast tumour subtypes were determined using ER, PR and HER2 immunohistochemistry (IHC) staining (paraffin-embedded material). The threshold of negative signs was classified for ER and PR at $\leq 10\%$ regardless of the staining intensity. Staining of HER2 was divided into negative (0/1+) and positive (2/3+), where 2+ staining was confirmed using SISH amplification. The histological grade was determined according to the Elston and Ellis classification (16). All the clinical information regarding the different patients included in the study can be found in **Table 1**.

Cohort 1 (37)		Cohort 2 (80)	
Characteristics	N	Characteristics	N
Age (year) (37)		Age (year) (80)	
> 57	18	> 58	40
≤ 57	19	≤ 58	40
BC subtype (37)		BC subtype (80)	
LumA	13	LumA	30
LumB	10	LumB	14
HER-2	4	HER-2	6
TN	10	TN	30
Grade (36)		Grade (79)	
I	5	I	9
II	21	II	37
III	10	III	33
pT (mm) (35)		pT (mm) (78)	
≤ 20	18	≤ 20	35
20-50	16	20-50	41
≥ 50	1	≥ 50	2
pN (36)		pN (80)	
negative	17	negative	41
positive	19	positive	39
ER status (37)		ER status (80)	
negative	14	negative	36
positive	23	positive	44
PR status (37)		PR status (80)	
negative	15	negative	39
positive	21	positive	41
HER-2 status (37)		HER-2 status (80)	
negative	23	negative	60
positive	14	positive	20

Table 1: Clinical information regarding the patients included in the study. The table on the left represents the cohort 1, which we used to quantify the expression of *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *P62/SQSTM1* mRNA levels. The table on the right (cohort 2) represents the total cohort, which we used to further analyze *ATG9A* mRNA levels in BC. N: number of patients; the numbers in brackets are the total number of analyzed samples among the cohort; pT: tumor size; pN: Lymph node status; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER-2: human epidermal growth factor receptor-2.

Reagents and antibodies

Earle's balanced salt solution (EBSS, E3024) and Bafilomycin A1 (BAFA1, B1793) were purchased from Sigma-Aldrich. For the Western Blotting experiments, the following antibodies were used: rabbit monoclonal anti-ATG9A (Abcam, ab108338, 1:1000), rabbit polyclonal anti-LC3B (Sigma-Aldrich, L8918, 1:3000), rabbit polyclonal anti-P70S6K (Cell signaling, #9202, 1:1000), rabbit polyclonal anti-phospho-P70S6K (Cell signaling, #9205,

1:1000), rabbit polyclonal anti-ACTIN (Sigma-Aldrich, A5060, 1:10000) and secondary goat polyclonal anti-rabbit HRP (P.A.R.I.S, BI2407, 1:10000).

Stable cell lines

To create the MDA-MB-436-sh-RNA-*Control* (1 and 2) and *-ATG9A* (A, B and C) cell lines, MDA-MB-436 cells (340,000) were plated in 6-well plates. The day after plating, cells were transfected using 2 µg of pLKO.1-puro-shRNA-*Control* vector (Mission non-mammalian shRNA control plasmid, Sigma Aldrich, SHC002) or pLKO.1-puro-shRNA-*ATG9A* vector (Mission shRNA, Sigma Aldrich, SHCLNG-NM_024085.3-3318s21c1) and 4 µL Jetprime reagent (Polyplus, 114-07), according to the manufacturer's protocol. Two days later, puromycin (5 µg/ml) was added to the cells and the medium was changed every 2 days for the next 14 days until the detection of antibiotic-resistant single clones. Three resistant clones for each shRNA transfection were then tested for the expression of *ATG9A* mRNA and protein by qRT-PCR and Western-Blotting, respectively. The stable cell lines, which were used in this study were the MDA-MB-436-shRNA-*Control* clones 1 and 2 and the MDA-MB-436-shRNA-*ATG9A* clones A, B and C.

To create the MDA-MB-436-CRISPR-*Control* (I and II) and *-ATG9A* (a, b, c and d) cell lines, MDA-MB-436 cells (340,000) were plated in 6-well plates. The day after plating, cells were transfected using 2 µg of pSpCas9(BB)-2A-GFP-*Control* vector (Addgene, 48138) or pSpCas9(BB)-2A-GFP-*ATG9A* (sgRNA sequence: TTCACATGTATGCTCATCG) and 4 µL Jetprime reagent reagent (Polyplus, 114-07), according to the manufacturer's protocol. These two vectors were kindly provided by Dr. Marc Vigneron (UMR7242, Strasbourg, France). One day later, GFP-positive cells were sorted using a cell sorter (Sony, SH800S) and plated in 6-well plates (500 cells/well) until the detection of single clones. Four clones were then tested for the expression of *ATG9A* protein by Western-Blotting. The stable cell lines which were used in this study were the MDA-MB-436-CRISPR-*Control* clones I and II and the MDA-MB-436-CRISPR-*ATG9A* clones a, b, c and d.

Sequencing of CRISPR-Cas9 clones

Total gDNA were extracted using the kit "NucleoSpin[®] Tissue Genomic DNA from tissue and cells" (Macherey-Nagel, 740952), according to manufacturer's recommendations. Then, a PCR was run on the T100[™] Thermal Cycler (Bio-rad) using 50 ng of total gDNA, the GoTaq[®] G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, M7422) and the following parameters: 2 min at 95°C followed by 40 cycles: 20 s at 95°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C.

The primer sequences, which amplify the gRNA-targeted DNA sequence in the *ATG9A* gene in our CRISPR-*ATG9A* clones, were: forward; 5'-CACCACATCATCTGTCCCTTC-3' and reverse; 5'-AGTCTGTGCTCTTACCTGC-3'. We cloned our PCR products in the pJET1.2/blunt Cloning vector using the CloneJET PCR cloning kit (ThermoFisher, K1231), according to manufacturer's protocol and the resulted plasmids were used for transformation of *E. coli* JM109 bacteria by heat shock. Briefly, 50 ng of ligated plasmid was added to 50 μ L of competent bacteria and were incubated on ice during 20 min. Then, the mixture was heat shocked by placing tubes into a 42°C water bath for 90 s before putting the tubes back on ice for 2 min. Culture medium (800 μ L of LB) was added to the bacteria and grown in 37°C shaking incubator for 45 min before plating bacteria onto a 10 cm LB agar plate containing 100 μ g/mL of Ampicillin. One day later, the positive bacteria clones were amplified before plasmid purification using the kit NucleoSpin[®] plasmid (Macherey-Nagel, 740588), according to manufacturer's protocol. We then performed DNA sequencing of plasmidic DNA using the Sanger Method using a Genetic Analyser (Applied Biosystems, 3130 Genetic Analyser) and the following primer sequences: forward; 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' and reverse; 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'.

Cell culture and treatments

MDA-MB-436-*Control* cells (clones 1 and 2 for shRNA-*Control* or I and II for CRISPR-*Control*), MDA-MB-436-sh-*ATG9A* (clones A, B and C), MDA-MB-436-CRISPR-*ATG9A* (clones a, b, c and d) were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Dutscher, L0066) supplemented with 100 μ g/mL penicillin/streptomycin (Dutscher, L0018), 10 % fetal bovine serum (FBS) (Dutscher, S1810) and 0.4 mg/L amphotericin B in a 5 % CO₂ atmosphere at 37°C. To inhibit autophagosome/lysosome fusion, cells were incubated for 2 h in complete medium supplemented with 100 nM Bafilomycin A1. To induce autophagy, cells were incubated in EBSS for 2 h at 37°C.

Western Blotting

Cells were scraped and harvested in cold Phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) and lysed in SB1X (45 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10% Glycerol, 2% SDS, 1.5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue). Protein lysates were sonicated for 10 s (Sonics and Materials, Vibra-Cell) before loading (20 μ g) and then separated on a 10 or 12.5 % polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 1% SDS) at 20 mA for 80 min, before being transferred onto a

polyvinylidene difluoride (PVDF) 0.2 μm membrane (Bio-Rad, 162-0177) at 200 mA for 2 h in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 10% methanol). The membrane was blocked with 5 % nonfat milk in Tris-buffered saline supplemented with Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) for 1 h and incubated with primary antibodies at the previously indicated dilutions in TBS-T supplemented with 1 % nonfat milk or 5 % bovine serum albumin (BSA) (for Cell Signaling primary antibodies), overnight at 4°C. Following three washes in TBS-T, immunoreactive bands were detected using secondary goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-rabbit antibody and the Clarity Western ECL blotting substrate (Biorad, 1705061). The signals were then analyzed and quantified using the ChemiDoc XRS+ system (Biorad) and the Image Lab software (Biorad).

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNAs were extracted using Tri Reagent (Molecular Research Center, TR-118) as previously described (17). Briefly, the cell pellet was resuspended in 0.2 mL of chloroform and 750 μL of Tri Reagent before centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4°C. Total RNAs were then precipitated using 0.5 mL of isopropanol and centrifugation at 10,000 g for 20 min at 4°C. The RNA pellet was washed with 70 % ethanol before solubilization in water (30 μL) and then incubated for 10 min at 65°C. Total purified RNAs were then quantified before conservation at -80°C.

For RNA extraction from patient samples, 20 mg of breast tissue (tumor or healthy adjacent tissue) was reduced in liquid nitrogen before homogenization in 750 μL of Tri Reagent for 15 min at 30°C and centrifugation at 2550 g for 2 min in order to eliminate fat tissue. In order to purify total RNAs from adherent cells, 300,000 cells were scraped and harvested in cold PBS before homogenization in 750 μL of Tri Reagent.

For RT-qPCR analysis, 1.5 μg of total RNAs were reverse transcribed using the M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma, M1302), 1.25 μM of oligo(dT)₂₃ and 1.25 μM of random primers (Promega, C1181). 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 °C followed by 40 cycles: 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The target gene levels (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *SQSTM1*) were normalized to the ratio of 2 housekeeping gene expression: *RPLP0* and *18S rRNA*. The target gene levels for cell samples (*ATG9A* and *TFEB*) were normalized to the *18S rRNA* gene expression. The primer sequences used for qPCR analysis are described in the

Table 2. Each sample was analyzed in duplicate and then differences in the expression of each gene were quantified using the standard curve method using plasmids containing the cloned target sequences as controls. For *TFEB*, the differences in the expression were quantified using the $\Delta\Delta C_t$ method using an endogenous control.

Gene	Forward	Reverse
<i>18S rRNA</i>	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
<i>ATG9A</i>	5'-TTTGC GTTAGGGTGAAGACC-3'	5'-AGGGCAGCAAAGTATTTCCA-3'
<i>ATG9B</i>	5'-CCTTGGGCAGTTCTTCTTTG-3'	5'-CTTCCTGGTGCCTGGTACAT-3'
<i>BECLIN1</i>	5'-TCACCATCCAGGAACCTACA-3'	5'-CCTGGCGAGGAGTTTCAATA-3'
<i>LC3B</i>	5'-CGGAAAGCAGCAGTGTACCA-3'	5'-GGCAGAAGGGAGTGTGTCTGA-3'
<i>NIX</i>	5'-AAGGCAGGCTTCATTTTCA-3'	5'-CCAATAATTTCCACAACGGG-3'
<i>RPLP0</i>	5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3'	5'-GCCTGACCTTTTCAGCAAG-3'
<i>SQSTM1</i>	5'-ATCGGAGGATCCGAGTGT-3'	5'-TGGCTGTGAGCTGCTCTT-3'
<i>TFEB</i>	5'-GCGGCAGAAGAAAGACAATC-3'	5'-CTGCATCCTCCGGATGTAAT-3'

Table 2: Primer sequences used for SyberGreen qRT-PCR experiments

Cell invasion assay

Cell invasion was evaluated using modified Boyden chambers (ThinCert for 24 well plates, 8 μ m pore size, Greiner Bio-one, 438122). Boyden chambers were coated with 50 μ g ECM gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma-Aldrich, E1270) diluted in DMEM for 5 h at 37 °C. A total of 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 a 24 h incubation in a 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C, cells in the upper compartment were removed using a swab and cells in the lower compartment were fixed for 5 min with absolute ethanol then stained with crystal violet (0.5 % in 2 % ethanol) for 10 min. The filters were then washed with distilled water and cell density was quantified using the Threshold_Colour plugin of the ImageJ software.

Cell proliferation assays

For the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, M5655) assay, cells were plated in 96-well plates (3,000 cells per well, 16 wells per cell line) and MTT assays were conducted every day over a 4 day-period as previously described (18). Briefly, 100 μ L of a 0.5 mg/mL MTT solution, diluted in sterile PBS, was added in each well, then incubated for 2 h in 5 % CO₂ at 37°C. Following a 5 min

centrifugation at 500 g, the MTT solution was discarded and 50 μ L of Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well. Then the absorbance was measured at 549 nm with a reference wavelength at 620 nm using a microplate reader (Thermo Scientific, Multiskan FC).

For the trypan blue exclusion assay, cells were plated in 24-well plates (30,000 cells per well, 2 wells per cell line) and cells were counted every day over a 4 day-period. After discarding the culture medium, cells were incubated in 100 μ L Trypsin-EDTA (Dutscher, X-0930) for 5 min at 37°C before the addition of 200 μ L of complete medium and centrifugation at 500 g for 5 min. The cell pellet was then resuspended in 50 μ L of trypan blue (0.04% in PBS, Corning, 702630) and the number of viable cells was then determined using a Malassez haemocytometer.

Xenograft experiments

Nude Balb/c J mice (Female, 4 weeks) were obtained from Charles River Laboratories (France) (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 (agreement number #2008-2508-04649). A total of 5×10^6 cells of the different cell lines, resuspended in a total volume of 100 μ L of PBS, were inoculated in the mammary fat pads. Two injections (each side) were performed per mouse (n = 6 per group) and tumor growth was monitored weekly over a 1 month-period.

Flow cytometry

Cells were plated in 6-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C overnight. Cells were stained with 50 nM LysoTracker® Green DND-26 (Life technologies, L-7526) for 30 min. Cells were washed twice with PBS then trypsinized and resuspended in 500 μ L complete medium before being harvested at 5,000 g for 5 min and resuspended in 250 μ L PBS. Cells (10,000 events) were then examined using a FC500 Beckman Coulter flow cytometer. Data were analyzed using the FlowJo software.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Student t test. Data are expressed as the mean \pm SEM. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ and ***: $P \leq 0.001$

RESULTS

ATG9A mRNA levels are increased in breast cancers

The different BC subtypes are classified depending on their molecular marker expression. Luminal BCs, Luminal A and Luminal B, which represent 70 % of total BCs (19), are generally associated with a good prognosis and are characterized by ER α (estrogen receptor) expression (ER⁺) whereas the amplification of the *HER2* gene (Human Epidermal growth factor Receptor 2) is only observed in the Luminal B subtype. The HER2⁺ BC subtype, which represents 10-15 % of overall BCs, presents an amplification of the *HER2* gene without the expression of ER α (ER⁻). TNBCs, which present no expression of ER, PR or HER2, generally exhibit poor outcomes. Consequently, TNBC present a significant challenge and molecular-profiling efforts are under progress in order to determine new promising targets. Since autophagy has been reported to be involved in TNBC chemotherapy efficiency, we decided to analyze the expression of several *ATG* genes, in order to determine whether *ATG* gene expression is deregulated in BC. To this end, we first analyzed *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLINI*, *LC3B*, *NIX* and *SQSTM1* mRNA levels in 37 human BC biopsies and compared their expression with the ones detected in healthy adjacent tissue, using qRT-PCR (**Figure 1A**). The clinical information regarding the patients whom samples have been used in our study can be found in **Table 1**. Our initial cohort included 13 Luminal A tumors, 10 Luminal B tumors, 4 HER2⁺ tumors and 10 TN tumors. Our results revealed no major difference in *ATG9B*, *BECLINI*, *LC3B*, *NIX* and *SQSTM1* mRNA expression between tumor and healthy adjacent tissues but we observed an increase of *ATG9A* mRNA expression in Luminal A, Luminal B and a greater increase in TN patients, even if these differences were not statistically significant. In order to confirm these data, we analyzed *ATG9A* mRNA levels in a larger cohort of 80 patients including 30 Luminal A, 14 Luminal B, 6 HER2⁺ and 30 TN (**Figure 1B**). The results obtained confirmed a significant increase of *ATG9A* mRNA levels in tumors compared to healthy adjacent tissues ($p=0.0355$). To date, only 7 out of 80 patients from our cohort present a cancer recurrence and amongst them, 5 presented an increase of *ATG9A* mRNA levels in tumor cells compared to the healthy adjacent tissues (3/5 patients were diagnosed with TN and 2/5 were with Luminal B). However, due to the low number of patients presenting a cancer recurrence, we were not able to show a significant difference between patients presenting a high *ATG9A* mRNA expression compared to the patients with a low *ATG9A* mRNA expression. To establish the relevance of a link between *ATG9A* expression levels and clinical outcome in TNBC, we used the online survival analysis tool

“KM plotter” (*kmplot.com*), which integrates numerous gene expression data and survival information derived from 3,951 patients from databases such as The Cancer Genome Atlas (TCGA) (20). The correlation of *ATG9A* expression levels with relapse free survival (RFS) in TNBC was determined (**Figure 1B**) and we observed that high *ATG9A* levels were correlated with shorter RFS, suggesting a potential link between *ATG9A* mRNA expression and survival of patients presenting a TNBC subtype.

sh-RNA-driven extinction of ATG9A, but not CRISPR-induced extinction, inhibits in vitro cell proliferation and invasion and in vivo tumor growth

In order to determine whether the high *ATG9A* mRNA levels quantified in TN tumors were a cause or a consequence of tumor development, we decided to inhibit *ATG9A* expression in the TNBC cell line MDA-MB-436 using sh-RNA or CRISPR-Cas9 technologies (**Supp. Figure 1**). First, we transfected MDA-MB-436 cells with the pLKO.1 *ATG9A* MISSION shRNA plasmid (*Sigma*), which encodes a shRNA specifically targeting the *ATG9A* mRNA (target sequence localized in the exon 16). We then selected and analyzed several antibiotic resistant clones (clones A, B and C). These clones exhibited a strong decrease in *ATG9A* mRNA levels (**Figure 2A**) as well as protein levels (**Figure 2B**), when compared to the control cell lines transfected with a vector coding a scramble shRNA (clones 1 and 2). Then we used the CRISPR-Cas9 protocol to create CRISPR-*ATG9A* cell lines. We first transfected MDA-MB-436 cells with the pSpCas9(BB)-2A-GFP-*ATG9A* vector (*Addgene*, 48138) which encodes the Cas9-GFP protein as well as a gRNA (guide RNA) specifically targeting the *ATG9A* gene (target sequence in the exon 5). Following transfection, the GFP-positive cells were selected and several clones were analyzed for *ATG9A* expression. Our different CRISPR-*ATG9A* clones, a, b, c and d, exhibited a strong decrease in protein levels (**Figure 2D**). We still detected the *ATG9A* mRNA in the CRISPR-*ATG9A* clones but this was expected since the CRISPR-Cas9 technology does not necessary leads to the degradation of the mRNA but can induce the insertion of mutation in the gene leading to the non-expression of the protein (**Figure 2C**).

We then investigated whether a decrease of *ATG9A* expression in the MDA-MB-436 cell line would alter its tumor-linked features such as *in vitro* proliferation and invasion. We first analyzed cell proliferation by performing a MTT assay and a cell viability assay (trypan-blue exclusion test). The MTT results indeed showed that the sh-*ATG9A* cell lines exhibited a strong decrease in proliferation compared to the control cell lines. The trypan-blue exclusion assay confirmed these data since we observed a decrease in cell number but no significant

increased cell death (**Figure 2E**). Surprisingly, we did not observe any significant difference of proliferation when we compared the four CRISPR-*ATG9A* clones (a, b c and d) to the two control cell lines (I and II) (**Figure 2E**). Since the sh-*ATG9A* clones exhibited a decrease in cell proliferation, we then assessed their invasion capacity using modified Boyden chambers coated with ECM gel. Our results showed a significant decrease in the ability of invading the bottom chamber for all sh-*ATG9A* clones compared to control cell lines (**Figure 2F**). Together, these results suggested that *ATG9A* might regulate cell proliferation and invasion but, since we were not able to confirm these data with our CRISPR-*ATG9A* clones, we needed to further analyze these clones. We therefore performed DNA sequencing of the gRNA-targeted DNA sequence in the *ATG9A* gene in our different CRISPR-*ATG9A* clones. Our results highlighted an insertion of 1 adenine (clones a and b) or 2 adenines (clone d) in the *ATG9A* gene at the position targeted by the gRNA (**Supp. Figure 2**). These modifications led to a frameshift in the *ATG9A* open reading frame leading to the translation of two putative shorter new proteins of 68 (clones a and b) or 98 amino acids (clone d), respectively. More interestingly, these new proteins will only contain the N-terminal fragment of *ATG9A* and no longer contain the transmembrane domains leading to their relocalization in the cytosol. These conclusions might explain why we could not detect these two putative proteins since the antibody we used in our western-blotting experiments was directed against the C-terminal domain of *ATG9A*. Together, these results strongly suggest that our CRISPR clones could express a cytosolic N-terminal domain of the *ATG9A* protein, which may be sufficient to maintain the cancer functions of *ATG9A*.

In order to confirm our hypothesis we analyzed the behavior of our different sh and CRISPR clones on the regulation of tumor growth *in vivo*. To do so, we injected sh-*ATG9A* and CRISPR-*ATG9A* cells and the control cell lines in Nude Balb/c J mice and we monitored the size of the tumors for one month following the injection. In agreement with our *in vitro* experiments, the clones in which *ATG9A* expression was extinguished by shRNA presented a significant decrease of tumor growth compared to the control cells (**Figure 2G**). As expected, the CRISPR-*ATG9A* clones did not show any difference compared to the control cell lines (**Figure 2G**). These results confirmed that the CRISPR-*ATG9A* cells, which may express a mutated *ATG9A* mRNA and a truncated form of the *ATG9A* protein, maintain their pro-cancer abilities.

ATG9A extinction regulates the autophagy pathway

Since ATG9A has been described to play a major role in autophagosome formation in different *in vitro* cellular models (10,21), we decided to investigate whether an *ATG9A* extinction in MDA-MB-436 cells would also alter the autophagy flux. To do so, we quantified the levels of LC3B-II, the autophagosome-associated form of LC3B, in the absence and presence of the V-ATPases inhibitor Bafilomycin A1, which prevents the maturation of autophagic vesicles by inhibiting the fusion between autophagosomes and lysosomes (22). In the sh-*ATG9A* clones (A and B), without Bafilomycin A1, we observed a significant increase in LC3B-II levels compared to the control cells (1 and 2) (**Figure 3A**; compare lanes 1, 3, 4, 5, 7 and 9). When we added Bafilomycin A1, we observed a significant increase in LC3B-II levels in the sh-*ATG9A* clones (A and C) compared to the control cell lines (**Figure 3A**; compare lanes 2, 4, 6, 8 and 10). Regarding the CRISPR clones, even without Bafilomycin A1, our results revealed a significant increase in LC3B-II levels in all CRISPR-*ATG9A* clones (a, b, c and d) compared to the control cells (I and II) (**Figure 3B**; compare lanes 1, 3, 4, 5, 7 and 9). When we added Bafilomycin A1, we still detected a significant difference in total levels of LC3B-II between the CRISPR and the control clones (**Figure 3B**; compare lanes 2, 4, 6, 8 and 10). But, it is noteworthy that we did not observe any difference in autophagy flux (difference between the levels of LC3B-II in the Bafilomycin A1-treated cells *versus* the untreated cells) between the control and shRNA or CRISPR clones (**Figure 3A and B**). Altogether, these data suggested that a loss of *ATG9A* in MDA-MB-436 cells led to an increase of autophagosome number correlated to an increase of LC3B-II levels.

To determine whether this accumulation of autophagosomes was due to an increase of autophagy induction or a decrease of autophagosome degradation, we studied the phosphorylation of the kinase p70S6K, a direct mTORC1 substrate, in response to nutrient deprivation (culture in EBSS medium). Without treatment, we observed a significant decrease of p70S6K phosphorylation in sh-*ATG9A* cells compared to control cells (**Figure 3C**; compare lanes 1, 3, 5, 7 and 9), suggesting that the absence of *ATG9A* leads to autophagy induction since p70S6K is no longer phosphorylated by an activated mTORC1. However, we did not detect any difference in p70S6K phosphorylation in our CRISPR-*ATG9A* clones (**Figure 3D**; compare lanes 1, 3, 5, 7, 9 and 11) meaning that mTORC1 is still active and autophagy not induced. After incubation of the cells in EBSS, we observed a strong decrease of p70S6K phosphorylation in every clone (**Figures 3C and 3D**), decrease which was expected following nutrient deprivation and mTORC1 inhibition. Since we could not detect any difference between the shRNA and CRISPR clones and the control cell lines, it meant

that our clones were still responsive to autophagy induction signals. These data suggested that *ATG9A* extinction seemed to decrease mTORC1 activation and therefore led to the induction of autophagy, which could explain the higher levels of LC3B-II observed in our shRNA or CRISPR clones. But, the truncated form of ATG9A, produced in the CRISPR clones, might be sufficient to maintain p70S6K activation through mTORC1.

ATG9A extinction leads to an increase of intracellular acidic vesicles

During the final stage of autophagy, a mature autophagosome will fuse with a lysosome, a digestive organelle with an acidic lumen, to induce macromolecule and/or organelle degradation and recycling. Since *ATG9A* extinction led to autophagosome accumulation, we studied the role of ATG9A on lysosome number and acidification using LysoTracker green[®], a fluorescent dye which stains acidic compartments, including lysosomes. Flow cytometry analysis showed a significant increase in LysoTracker green[®] staining in sh-*ATG9A* (**Figure 4A**) and CRISPR-*ATG9A* cells (**Figure 4B**), compared to control cells. These data suggested that the loss of the C-terminal fragment of ATG9A and its membrane localization could lead to an increase of vesicle acidification or number. Since an increase of lysosome acidification or biogenesis could be linked to an increase of the expression of the transcription factor *TFEB* (23), we analyzed its mRNA levels by qRT-PCR. We found a significant increase of *TFEB* mRNA expression in sh-*ATG9A* cells compared to control cells (**Figure 4C**) but did not see any difference in CRISPR-*ATG9A* cells compared to control cells (**Figure 4C**). These results suggested that the loss of *ATG9A* expression led to an increase of vesicle acidification correlated with an increase of *TFEB* mRNA expression in sh-*ATG9A* cells but that the N-terminal domain of ATG9A may be sufficient to prevent TFEB induction but not vesicle acidification.

DISCUSSION

Triple negative breast cancer is an aggressive subtype with limited treatment options and very poor prognosis. Finding new biomarkers may be useful for better and earlier diagnosis but could also lead to the characterization of novel targets for therapy. Since many studies have shown a link between autophagy and breast cancer (24–26), this pathway may present a new way of treatment. Indeed, we have previously shown an inverse correlation between the *ATG GABARAPL1* mRNA expression and tumor stage in breast cancer (27) and other groups also found a link between *ATG* gene expression and breast cancer (15,28–30). Our study shows for the first time, that *ATG9A* mRNA expression is significantly increased in triple negative breast cancer patients (**Figure 1B**) and using the survival database “KM plotter”, we observed that high *ATG9A* levels are correlated with a significant shorter relapse-free survival (20). These data are partly inconsistent with a recent publication, showing that *ATG9A* mRNA expression is significantly decreased in invasive ductal carcinomas compared to matched non-tumoral tissues (15). However, when this study correlated *ATG9A* mRNA expression with clinicopathological characteristics (ER, PR or HER2 status), they showed a significant lower *ATG9A* expression in HER2 positive patients only. Our results are therefore consistent with these conclusions since we observed, in our cohort, an insignificant decrease, partly due to a to the low number of patients in this subgroup, n=6, of *ATG9A* mRNA expression in HER2 patients (**Figure 1B**).

Previous studies have shown that *ATG9A* is involved in autophagy induction and autophagosome formation (9,31). In order to characterize the role of the autophagy protein *ATG9A* in triple negative breast cancer, we established extinction models of *ATG9A* using sh-RNA (**Figure 2A and 2B**) or CRISPR-Cas9 (**Figure 2C and 2D**) in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-436. Then, we analyzed the protein levels of the autophagosome marker LC3B-II in our *ATG9A* models (**Figure 3A and 3B**). We found that *ATG9A* extinction (sh-RNA clones) or the production of a truncated form of *ATG9A* containing only the N-terminal cytosolic fragment of the protein (CRISPR-Cas9 clones) led to an increase in LC3B-II protein levels. Our data are consistent with a recent study conducted in the panc-1 pancreatic cancer cell line, showing that the extinction of *ATG9A* by si-RNA led to an increase of LC3B-II accumulation (32), but not with previous studies, performed in MEFs and HEK-293, which have shown a massive decrease of autophagosome number (9,21) following *ATG9A* extinction, suggesting a specific role of *ATG9A* in cancer cells. Furthermore, Bafilomycin A1 treatment did not conduct to an increase of LC3B-II accumulation in both

ATG9A extinction models, indicating a defect or a delay of degradation of autophagosomes in these cells. Kwon *et al.* have shown similar results in pancreatic cancer cells transfected with si-RNAs specific of *ATG9A* since they showed an inhibition of *ATG9A* expression led to a decrease of LAMP-2 and LC3B colocalization (32). Since we observed an increase of acidic vesicles in sh-*ATG9A* and CRISPR-*ATG9A* clones (**Figures 4A and 4B**), it is therefore possible that a loss of *ATG9A* function in cancer cells led to the accumulation of immature autophagosomes, due to the inhibition of their fusion with lysosomes and their subsequent degradation. Indeed, we observed an increase of *TFEB* mRNA levels in sh-*ATG9A* cells (**Figure 4C**), a marker of lysosomal biogenesis. However, in CRISPR-*ATG9A* cells, we did not observe any significant difference in *TFEB* mRNA levels compared to control cells, supporting the idea that an increase of lysosomal biogenesis observed in sh-*ATG9A* cells is not sufficient to induce the accumulation of acidic vesicles. Furthermore, Kwon *et al.* have shown a link between *ATG9A* and *TFEB* expression (32). Indeed, they demonstrated that the miR-29a downregulates *ATG9A* and *TFEB* through direct interaction with their 3'-UTR. We then hypothesized that *ATG9A* mRNA downregulation by sh-RNA could lead to a negative feedback regulation of miR-29a biogenesis, then inducing *TFEB* mRNA expression. This hypothesis could explain why the levels of *TFEB* are not modified in CRISPR-*ATG9A* cells since we still detect the mRNA in these cells even if it contains an insertion.

We then analyzed p70S6K phosphorylation, a direct mTORC1 target, in sh-*ATG9A* cells (**Figure 3C**) and CRISPR-*ATG9A* cells (**Figure 3D**) in order to find out whether the increase of LC3B-II levels might also be the consequence of increased autophagy induction. We indeed found a decrease of p70S6K phosphorylation and therefore an inhibition of mTORC1 and an induction of autophagy, but only in sh-*ATG9A* cells. These results suggested that the cytosolic form of *ATG9A* detected in CRISPR-*ATG9A* cells might be sufficient to keep the activation of mTORC1 and therefore basal levels of autophagy induction. If this is confirmed, the accumulation of LC3B-II in CRISPR-*ATG9A* cells might be only due to an inhibition of lysosome degradation and not to an increase of autophagy induction, unlike what is observed in sh-*ATG9A* cells.

Many studies have shown that the C-terminal region of *ATG9A* is required for its traffic and functions in autophagy (11,33,34). Our CRISPR-*ATG9A* clones still produced a mutated *ATG9A* mRNA and a truncated cytosolic form of *ATG9A*. An increase of LC3B-II levels and acidic vesicles were the only common phenotypes observed when comparing our two models of *ATG9A* extinction. These data therefore confirmed that the N-terminal region of *ATG9A* may not be essential for its function in the autophagy process in the MDA-MB-

436 cells but might play an essential role in the maintenance of the pro-cancer functions of ATG9A.

It is now widely accepted that autophagy presents dual functions in cancer since it can act as a tumor suppressor or a positive actor in cancer cell survival and proliferation (for a review, see (35)). Surprisingly, our two models of *ATG9A* extinction exhibited different cancer phenotypes *in vitro* and *in vivo*. Indeed, while the shRNA-*ATG9A* clones presented decreased proliferation and invasion phenotypes *in vitro* (**Figures 2E and 2F**) and tumor growth *in vivo* (**Figure 2G**), CRISPR-*ATG9A* clones exhibited no difference in cancer phenotypes (**Figures 2E and 2G**). We then hypothesized that the N-terminal cytosolic domain of ATG9A may be sufficient for its pro-cancer functions *in vitro* and *in vivo* but is not essential for the regulation of the autophagy process.

Taken together, our results deciphered the role of ATG9A in triple negative breast cancer *in vivo* and *in vitro* and highlighted the clinical relevance of *ATG9A* as a potential target in triple negative breast cancer patients. However, since this is the first study establishing a new function of ATG9A in triple negative breast cancer, future work will be necessary to characterize the molecular mechanisms leading to autophagosome accumulation in cancer cells exhibiting a loss of *ATG9A*. Furthermore, it would be interesting to characterize the specific function of the N-terminal cytosolic region of ATG9A, which we demonstrated to play a role in cancer cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

Aurore Claude-Taupin is supported by a fellowship from the “Région de Franche-Comté”. This work was supported by the “Ligue contre le cancer”. Authors are grateful to Virginie Mougey (INSERM U1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France) for her technical help using the FC500 Beckman Coulter flow cytometer.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Feb;66(1):7–30.
2. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1784–92.
3. Yadav BS, Sharma SC, Chanana P, Jhamb S. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 May 10;5(2):125–33.
4. Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel A-M, Bourachot B, Zago G, et al. Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy*. 2014 Nov 26;0.
5. Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, Xu J, Abeysundara N, Leung A, et al. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Jun 15;20(12):3159–73.
6. Wen J, Yeo S, Wang C, Chen S, Sun S, Haas MA, et al. Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Feb;149(3):619–29.
7. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Dec;14(12):759–74.
8. Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umehayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, et al. Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem*. 2005 May 6;280(18):18283–90.
9. Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*. 2006 Sep 15;119(Pt 18):3888–900.
10. Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, et al. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2012 May;23(10):1860–73.
11. Webber JL, Tooze SA. Coordinated regulation of autophagy by p38 α MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J*. 2010 Jan 6;29(1):27–40.
12. Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura S, Barr FA, Tooze SA. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J Cell Biol*. 2012 May 28;197(5):659–75.
13. Tang J-Y, Hsi E, Huang Y-C, Hsu NC-H, Chen Y-K, Chu P-Y, et al. ATG9A overexpression is associated with disease recurrence and poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2013 Dec;463(6):737–42.
14. Nunes J, Zhang H, Angelopoulos N, Chhetri J, Osipo C, Grothey A, et al. ATG9A loss confers resistance to trastuzumab via c-Cbl mediated Her2 degradation. *Oncotarget*. 2016 May 10;7(19):27599–612.
15. Zhang X, Li C, Wang D, Chen Q, Li C-L, Li H-J. Aberrant methylation of ATG2B, ATG4D, ATG9A and ATG9B CpG island promoter is associated with decreased mRNA expression in sporadic breast carcinoma. *Gene*. 2016 Sep 30;590(2):285–92.
16. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403–10.
17. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. 1993 Sep;15(3):532–4, 536–7.
18. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Mar 16;102(6):1024–31.
19. Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, et al. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 1993 Oct;28(1):9–20.

20. Györfly B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct;123(3):725–31.
21. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 8;106(49):20842–6.
22. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct.* 1998 Feb;23(1):33–42.
23. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 2011 Jun 17;332(6036):1429–33.
24. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* 2007 Mar;14(3):500–10.
25. Tan EY, Campo L, Han C, Turley H, Pezzella F, Gatter KC, et al. BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer; opposing functions in in situ versus invasive cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):467–74.
26. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007 Jul 1;21(13):1621–35.
27. Hervouet E, Claude-Taupin A, Gauthier T, Perez V, Fraichard A, Adami P, et al. The autophagy GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer.* 2015;15:729.
28. Tang H, Sebti S, Titone R, Zhou Y, Isidoro C, Ross TS, et al. Decreased BECN1 mRNA Expression in Human Breast Cancer is Associated with Estrogen Receptor-Negative Subtypes and Poor Prognosis. *EBioMedicine.* 2015 Mar;2(3):255–63.
29. Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C, et al. Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *J Pathol.* 2003 Dec;201(4):573–80.
30. Lebovitz CB, Robertson AG, Goya R, Jones SJ, Morin RD, Marra MA, et al. Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy.* 2015;11(9):1668–87.
31. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, et al. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci.* 2016 Sep 1;
32. Kwon JJ, Willy JA, Quirin KA, Wek RC, Korc M, Yin X-M, et al. Novel role of miR-29a in pancreatic cancer autophagy and its therapeutic potential. *Oncotarget.* 2016 Sep 10;
33. Staudt C, Gilis F, Tevel V, Jadot M, Boonen M. A conserved glycine residue in the C-terminal region of human ATG9A is required for its transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 20;
34. Weerasekara VK, Panek DJ, Broadbent DG, Mortenson JB, Mathis AD, Logan GN, et al. Metabolic-stress-induced rearrangement of the 14-3-3ζ interactome promotes autophagy via a ULK1- and AMPK-regulated 14-3-3ζ interaction with phosphorylated Atg9. *Mol Cell Biol.* 2014 Dec;34(24):4379–88.
35. Chen N, Karantza V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011 Jan 15;11(2):157–68.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: *ATG9A* mRNA is overexpressed in triple negative breast cancer.

(A) Quantification of *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *SQSTM1* mRNA levels using qRT-PCR, in Luminal A (LumA), Luminal B (LumB), HER2 and triple negative (TN) breast cancer biopsies compared to matched healthy adjacent tissues (n=37). Values were normalized with the ratio of two housekeeping genes *rRNA18S* and *RPLP0*. Data presented on scatter plots represent the log₂ of *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *SQSTM1* mRNA levels ratio in breast cancer biopsies over healthy adjacent tissues, for each patient.

(B) **Left panel** represents the ratio of *ATG9A* mRNA levels in LumA, LumB, HER2 and TN biopsies compared to matched healthy adjacent tissues (n=80). Data are expressed in log₂ of relative *ATG9A* mRNA expression, for each patient, normalized with the ratio of two housekeeping genes: *rRNA18S* and *RPLP0*. **Right panel** represents the log₂ of *ATG9A* mRNA levels in TN biopsies (right) and healthy adjacent tissues (left), normalized with the ratio of two housekeeping genes *rRNA18S* and *RPLP0*. Difference of expression was quantified using a paired t-test (p=0.0325). **Kaplan-Meier curve n°3** represents relapse-free survival (RFS) in TN patients expressing high (n=125) or low (n=124) *ATG9A* mRNA levels (p=0.008) (source: *kmplot.com*).

Fig.2: Inhibition of *ATG9A* expression by sh-RNA, but not by CRISPR-Cas9 protocol, in the MDA-MB-436 BC cell line, inhibits cancer phenotypes both in vitro and in vivo.

(A) *ATG9A* mRNA expression levels quantified by qRT-PCR in stable MDA-MB-436 clones expressing a shRNA-control (1 and 2) or a shRNA-*ATG9A* (A, B and C) (n=3, duplicate). Values were normalized using *rRNA18S*. Difference of expression was quantified using a t-test; compared to sh-control 1, p<0.0001 for all sh-*ATG9A* clones (A, B and C); compared to sh-control 2, p=0.0002 for sh-*ATG9A* clone A and p<0.0001 for sh-*ATG9A* clones B and C.

(B) Levels of *ATG9A* and *ACTIN* proteins in the stable MDA-MB-436 clones shRNA-Control (clones 1 and 2) or shRNA-*ATG9A* (clones A, B and C). A representative image of 3 independent experiments is shown on the left. The graph on the right represents the *ATG9A* protein levels normalized with *ACTIN* protein levels, quantified using the ImageLab software (n=3, sh-control clone 1 value=1). Difference of expression was determined using a t-test; compared to shRNA-Control 2, p=0.0023; p=0.0024 and p=0.0048 for sh-*ATG9A* clones A, B and C, respectively.

(C) *ATG9A* mRNA expression levels quantified by qRT-PCR in the MDA-MB-436 CRISPR-*control* (I and II) and CRISPR-*ATG9A* (a, b, c and d) clones (n=3). Values were normalized using *rRNA18S*.

(D) Levels of *ATG9A* and *ACTIN* proteins in the MDA-MB-436 CRISPR-*Control* (clones I and II) or CRISPR-*ATG9A* (clones a, b, c and d). A representative image of 3 independent experiments is shown on the left. The graph on the right represents the *ATG9A* protein levels normalized with *ACTIN* protein levels, quantified using the ImageLab software (n=3, CRISPR-*Control* clone I value=1). Difference of expression was determined using a t-test; compared to CRISPR-*Control* II, p=0.0010 for CRISPR-*ATG9A* clones a, b and d. p=0.0033 for CRISPR-*ATG9A* clone c.

(E) Proliferation rates of sh-*ATG9A* (graphs on the top) and CRISPR-*ATG9A* clones (graphs on the bottom) and their controls using MTT (left) and Trypan-blue exclusion (right) assays. MTT assays were conducted every day during a 4-day period (n=3, 16 replicates). Difference in cell proliferation was quantified using a t-test at day 4. ***: p≤0.001. **: p≤0.01. *: p≤0.05. For the trypan blue exclusion assay, viable cells were counted every day using a Malassez hemocytometer during a 3-day period (n=3, 4 replicates). Difference in cell number vs day 1 was quantified using a t-test at day 3 (graphs on the right). ***: p≤0.001. **: p≤0.01. *: p≤0.05.

(F) Invasion assay using sh-*ATG9A* (A, B and C) and control clones (1 et 2). A representative image of 3 independent experiments in 2 replicates is shown on the left. The graph on the right represents the percentage of cell density that migrates through the ECM-coated Boyden chambers after 24 hours, measured using the ImageJ software. The difference in cell density was quantified using a t-test. ***: p≤0.001.

(G) Tumor growth *in vivo* of sh-*ATG9A* (graph on the left) and CRISPR-*ATG9A* clones (graph on the right) and their control clones. Regarding sh-RNA cells, tumor size was measured weekly from day 5 to day 29. At this time, no tumor growth was observed for sh-*ATG9A* clone B. The difference in cell growth was quantified using a t-test at day 29. **: p≤0.01. *: p≤0.05. The tumor size of CRISPR-*control* and -*ATG9A* clones was measured weekly from day 9 to day 33.

Fig.3: *ATG9A* extinction leads to an increase in *LC3B-II* levels in the MDA-MB-436 cell line, which is linked to a decrease of *P70S6K* phosphorylation in sh-*ATG9A* cells.

(A) Levels of *LC3B* and *ACTIN* proteins in sh-*Control* (1 and 2) and sh-*ATG9A* (A, B and C) clones in the presence or absence of Bafilomycin A1 (BAF). A representative image of 4

independent experiments is shown on the top. The graph on the bottom represents the LC3B-II protein levels normalized with ACTIN protein levels, quantified using the ImageLab software (n=4). The difference in LC3B-II levels was quantified using t-test. ***: $p \leq 0.001$. **: $p \leq 0.01$. *: $p \leq 0.05$.

(B) The levels of LC3B and ACTIN in CRISPR-*Control* (I and II) and CRISPR-*ATG9A* (a, b, c and d) clones in the presence or absence of BAF. A representative image of 3 independent experiments is shown on the top. The graph on the bottom represents the LC3B-II protein levels normalized with ACTIN protein levels, quantified using the ImageLab software (n=3). The difference in LC3B-II levels was quantified using t-test. **: $p \leq 0.01$. *: $p \leq 0.05$.

(C) Levels of phosphorylated P70S6K (P-P70S6K), P70S6K and ACTIN in sh-*Control* (1 and 2) and sh-*ATG9A* (A, B and C) clones treated, or not, during 2 hours with EBSS to induce autophagy. A representative image of 4 independent experiments is shown on the top. The graph on the bottom represents the ratio of protein levels of P-P70S6K/total P70S6K, normalized with ACTIN protein levels, quantified using the ImageLab software (n=4). The difference in P-P70S6K levels was quantified using a t-test. *: $p \leq 0.05$.

(D) Levels of phosphorylated P-P70S6K, P70S6K and ACTIN in CRISPR-*Control* (I and II) and CRISPR-*ATG9A* (a, b, c and d) clones treated, or not, during 2 hours with EBSS. A representative image of 3 independent experiments is shown on the top. The graph on the bottom represents the ratio of protein levels of P-P70S6K/total P70S6K, normalized with ACTIN protein levels, quantified using the ImageLab software (n=2). The difference in P-P70S6K levels was quantified using a t-test.

Fig.4: *ATG9A* inhibition leads to an increase of lysotracker staining, which is linked to an increase of *TFEB* mRNA expression in sh-*ATG9A* cells.

(A) (B) Acidic vesicles were stained with Lysotracker Green DND-26 during 30 min in sh-*Control* and -*ATG9A* **(A)** or CRISPR-*Control* and -*ATG9A* **(B)** clones. The staining intensity was then measured by flow cytometry for each cell line. Histograms present the staining intensity of sh-*Control* clone 1 **(A)** or CRISPR-*Control* clone I **(B)** (black line) compared with sh-*ATG9A* clone A, B and C (**(A)**, histograms A, B and C respectively) or compared with CRISPR-*ATG9A* clones a, b, c and d (**(B)**, histograms a, b, c and d respectively). These data are representative of 4 independent experiments. The difference between Lysotracker Green staining was performed using a t-test. ***: $p \leq 0.001$. *: $p \leq 0.05$.

(C) Quantification of *TFEB* mRNA expression using qRT-PCR in sh-*ATG9A* (graph 1) and CRISPR-*ATG9A* (graph 2) and control cells (n=3, duplicate). Difference in expression levels was quantified using a t-test. ****: $p \leq 0.001$. p **: $p \leq 0.01$.

Supp. Fig. 1: Scheme showing the sequences and the positions of the sh-RNA and gRNA used to create the stable sh-*ATG9A* and CRISPR-*ATG9A* clones, respectively.

(A) The pLKO.1 MISSION™ shRNA plasmid (*Sigma*) was transfected in the MDA-MB-436 cell line in order to create the sh-*ATG9A* clones. The shRNA targets the *ATG9A* mRNA transcript in the exon 16, between the nucleotides 3419 and 3439.

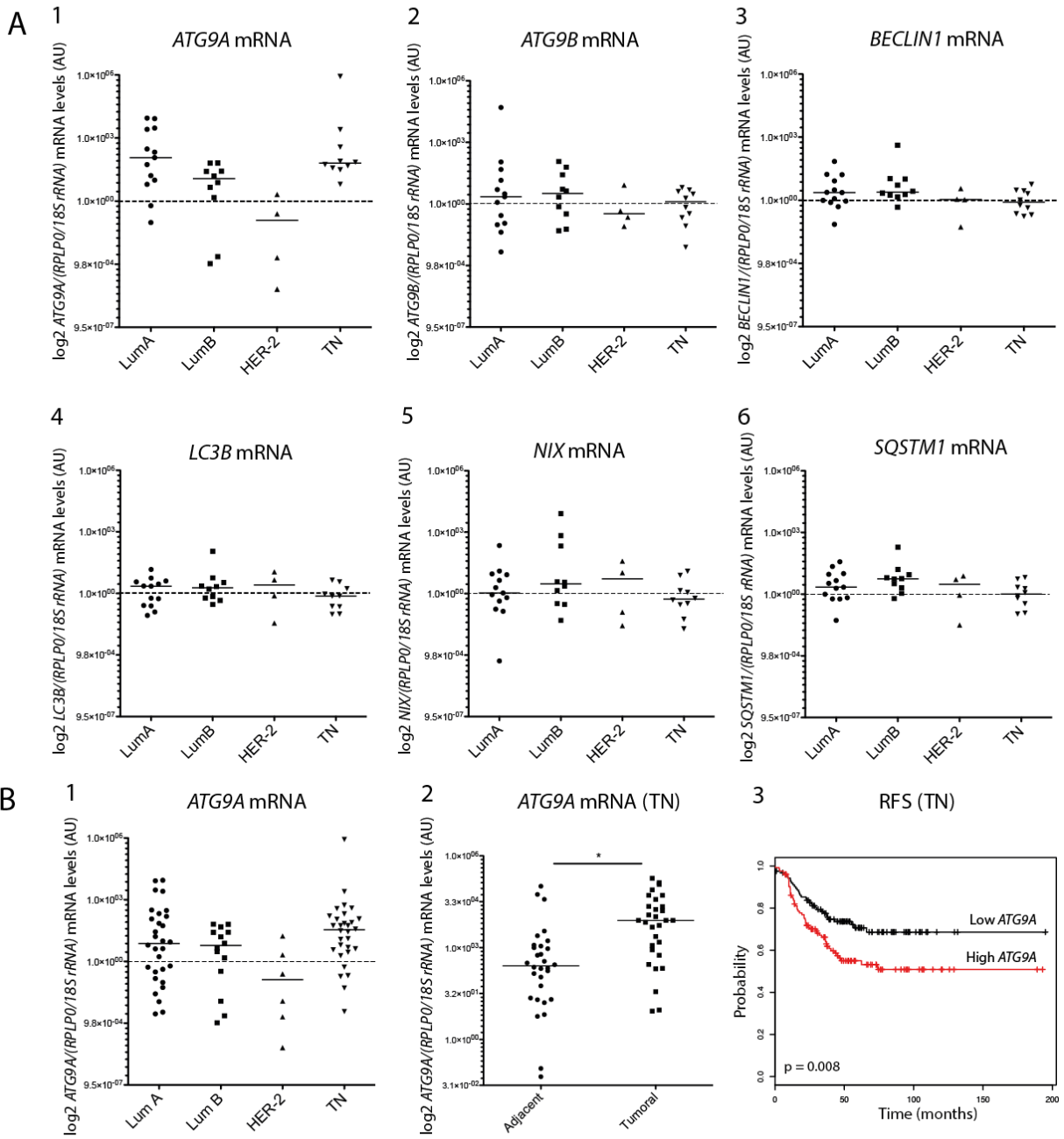
(B) The pSpCas9(BB)-2A-GFP plasmid (*Addgene*) modified to produce the gRNA presented on the top was transfected in the MDA-MB-436 cell line. The gRNA targets the exon 5, between nucleotides 2782 and 2800, within the *ATG9A* gene.

Supp. Fig. 2: DNA sequencing of CRISPR-*ATG9A* clones and putative proteins expressed.

(A) The DNA fragment framing the sequence targeted by the gRNA within the *ATG9A* gene in our different CRISPR-*ATG9A* clones was sequenced. While the two control clones (I and II) contained the wild-type *ATG9A* gene sequence, an insertion of 1 adenine (clones a and b) or 2 adenines (clone d) in the *ATG9A* gene was detected in our CRISPR-*ATG9A* clones.

(B) The mutations in the *ATG9A* gene detected in our CRISPR-*ATG9A* clones led to a frameshift in the *ATG9A* open reading frame leading to the translation of two putative new proteins of 68 (clones a and b) or 98 amino acids (clone d), respectively. These new proteins are predicted to contain only the first 63 amino acids of the *ATG9A* protein and no longer contain the transmembrane domains therefore inducing their cytosolic relocalization.

Figure 1



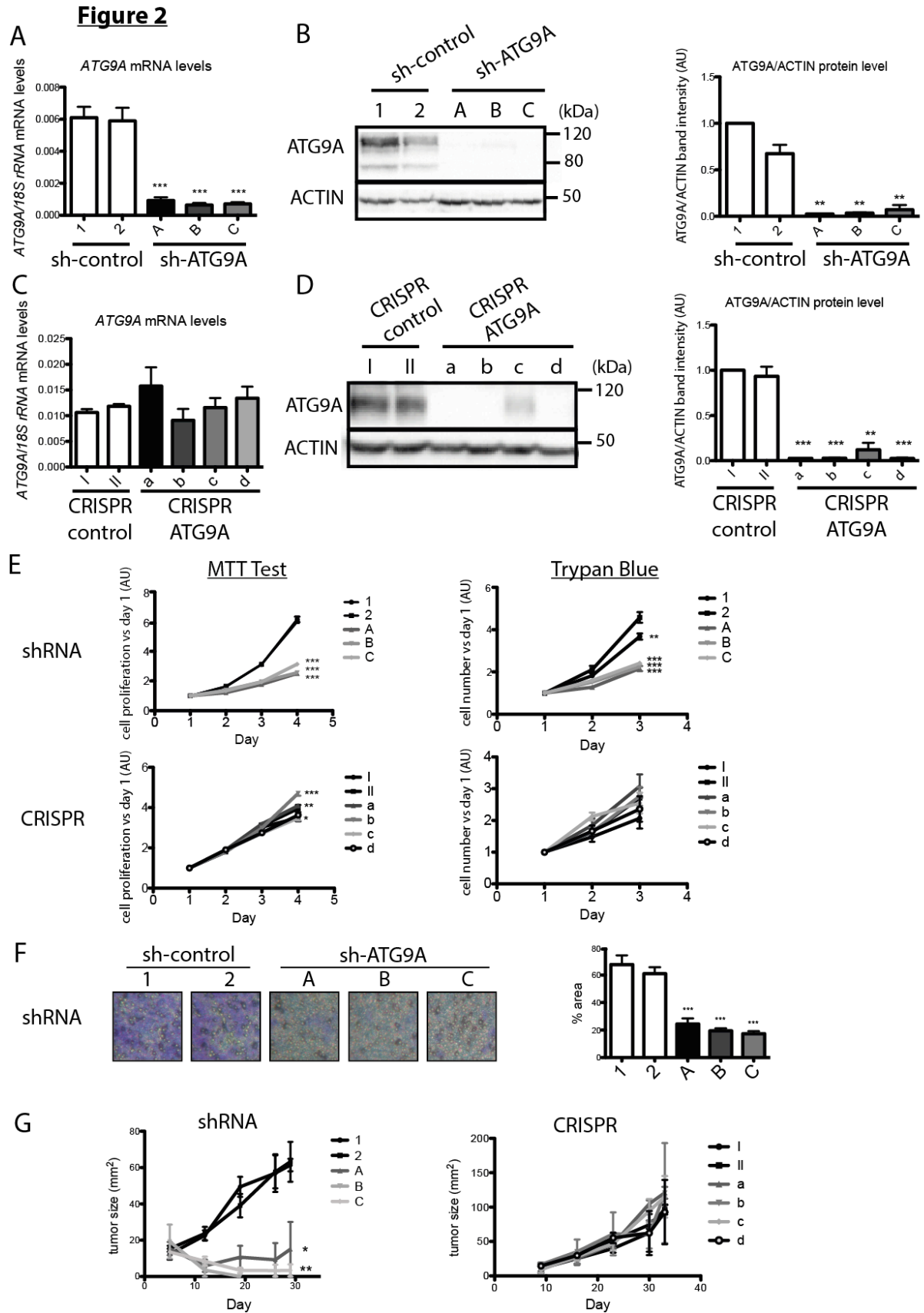


Figure 3

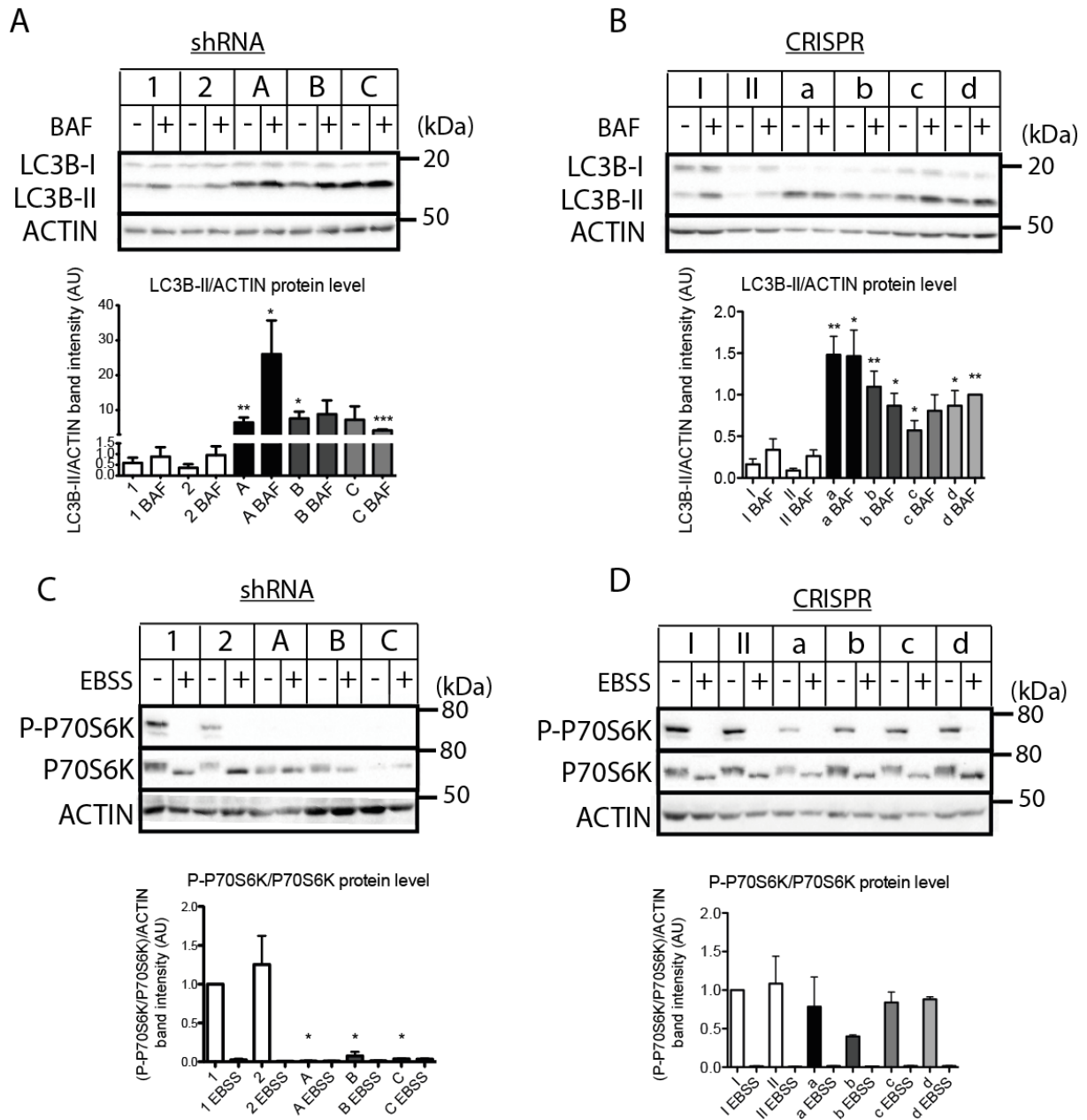
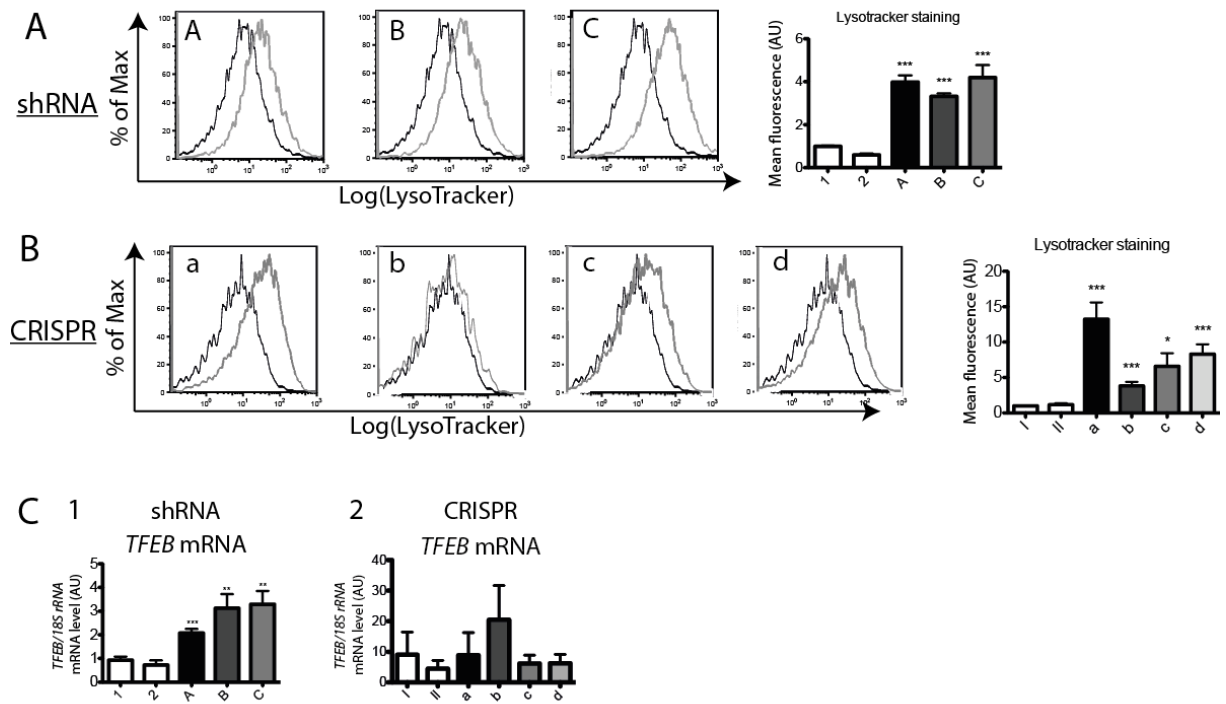
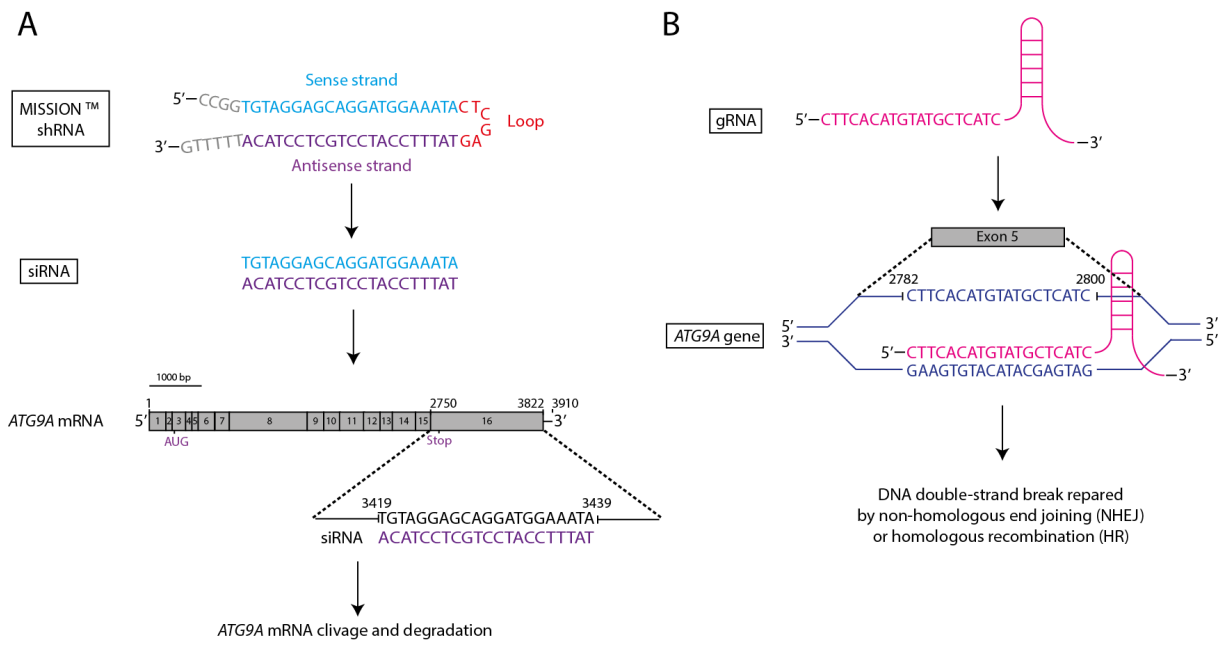


Figure 4



Supp. Figure 1



Supp. Figure 2

A

ATG9A gene (gRNA target sequence)	CTTCACATGTATGCTCATC
control clones I and II	CTTCACATGTATGCTCATC
clone a	CTTCACATGTATGCTCAATC
clone b	CTTCACATGTATGCTCAATC
clone d	CTTCACATGTATGCTCAAAATC

B

	1		63	TM domain	100	839
ATG9A protein (WT)	MAQFDTEYQRLEASYS	DSPPGEEDLLVHVAEGSKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFTCMLE	IGEIFELMQFLFVVAFTFLVSCVDYDILFANKMVNH//			
clones a & b	MAQFDTEYQRLEASYS	DSPPGEEDLLVHVAEGSKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFTCMLE	NRGDL			
clone d	MAQFDTEYQRLEASYS	DSPPGEEDLLVHVAEGSKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFTCMLE	KSGRSLSSCSSLWLPSPSWSAAWTMTSYLPTRW			98

3.1.1 Rôle d'ATG9A dans la lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231

L'étude du rôle d'ATG9A dans la lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-436 (**Publication II**) a permis de mettre en évidence un rôle important de cette protéine dans les phénotypes cancéreux. Nous avons ensuite voulu confirmer que c'était également le cas dans d'autres lignées de cancer du sein triple négatif. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié l'expression de l'ARNm *ATG9A* dans cinq lignées de cancer du sein, correspondant au sous-type triple négatif : BT549, MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-436, et MDA-MB-468. Les résultats sont présentés dans la **Figure 19**. Ces données ont permis d'observer que la lignée MDA-MB-436 présente un taux d'expression de l'ARNm *ATG9A* significativement plus bas comparé aux autres lignées de sous-type triple négatif testées ($p \leq 0,020$).

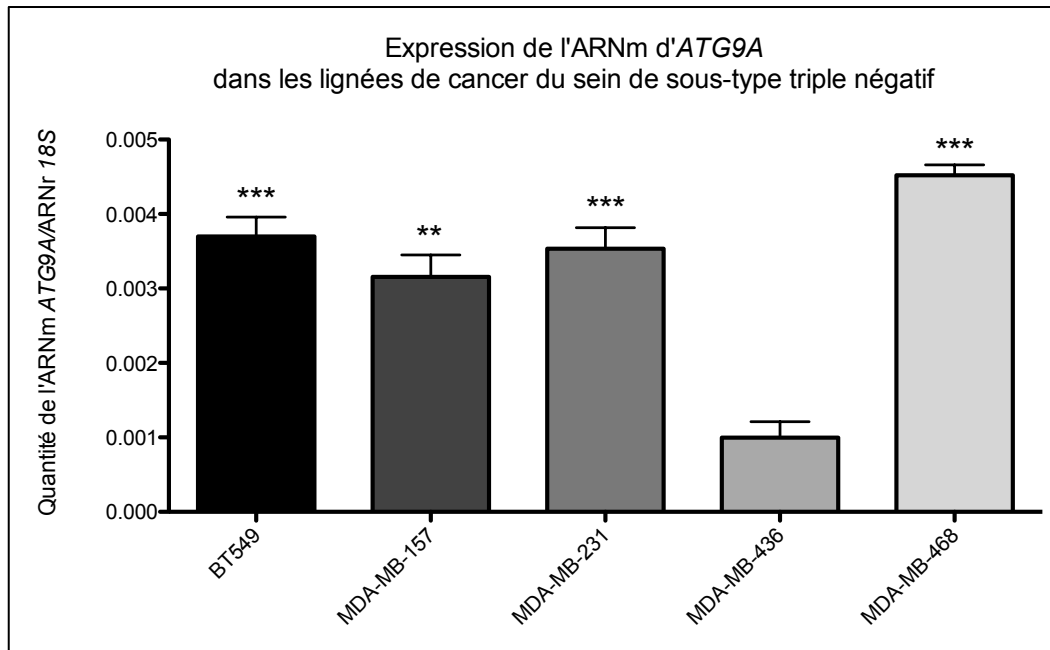


Figure 19 : Expression de l'ARNm d'ATG9A dans les lignées de cancer du sein triple négatif. Les ARN des différentes lignées ont été extraits à l'aide de la méthode Trizol. La transcription inverse de 1,5 µg d'ARN a été réalisée avec l'enzyme M-MLV (*Sigma*) et les ADNc obtenus ont été dilués au 1/80^e avant d'être quantifiés par qRT-PCR (n=2, protocole détaillé dans la **Publication II**). Les statistiques ont été réalisées à l'aide d'un t-test, en comparant l'expression d'ATG9A dans la lignée MDA-MB-436, comparé aux autres lignées ($p=0,0006$; $0,002$; $0,001$ pour les lignées BT-549, MDA-MB-157 et MDA-MB-468, respectivement et $p < 0,0001$ pour la lignée MDA-MB-231).

Cependant, l'étude du taux d'ATG9A par Western-Blotting dans ces lignées n'a pas permis de montrer une différence significative de l'expression de cette protéine entre la lignée MDA-MB-436 et les autres lignées de sous-type triple négatif, à l'exception de la lignée MDA-MB-157 ($p=0,0368$) (**Figure 20**). La lignée MDA-MB-231 étant la seule des lignées testées présentant une mutation de la protéine RAS (Hollestelle *et al*, 2010), impliquée dans le maintien de l'agressivité et du phénotype mésenchymateux de ces cellules (Kim *et al*, 2015).

De plus, de nombreuses études ont montré un rôle complexe de RAS dans la régulation du processus autophagique (Pattingre *et al*, 2003; Furuta *et al*, 2004; Lock *et al*, 2011), c'est pourquoi nous avons souhaité comparer le rôle de la protéine ATG9A dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436, ne présentant pas de mutation de RAS (**Publication II**).

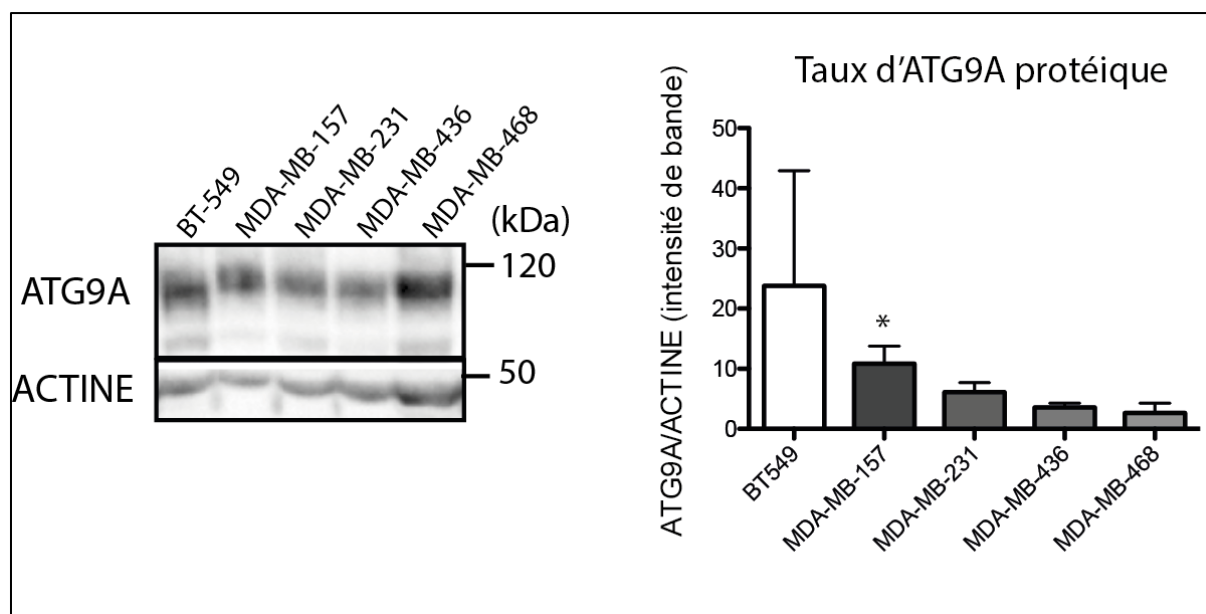


Figure 20 : Expression d'ATG9A dans les lignées de cancer du sein triple négatives. Analyse du taux de la protéine ATG9A par Western-Blotting, normalisé sur la quantité d'ACTINE. L'image est représentative de 10 expériences indépendantes. Le taux d'ATG9A présenté sur le graphique a été quantifié par mesure de l'intensité des bandes avec le logiciel ImageLab puis normalisé avec la quantité d'ACTINE (protocole détaillé dans la **Publication II**).

Dans ce but, nous avons éteint l'expression d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-231 à l'aide de l'expression stable de sh-ARN, identique à celui utilisé dans la lignée MDA-MB-436 (**Figure 18A**). Après sélection, les clones obtenus (a et b) présentent une diminution significative de l'expression de l'ARNm ($p < 0,0001$) (**Figure 21A**) et de la protéine ($p < 0,0008$) (**Figure 21B**), comparé aux clones contrôles (I et II).

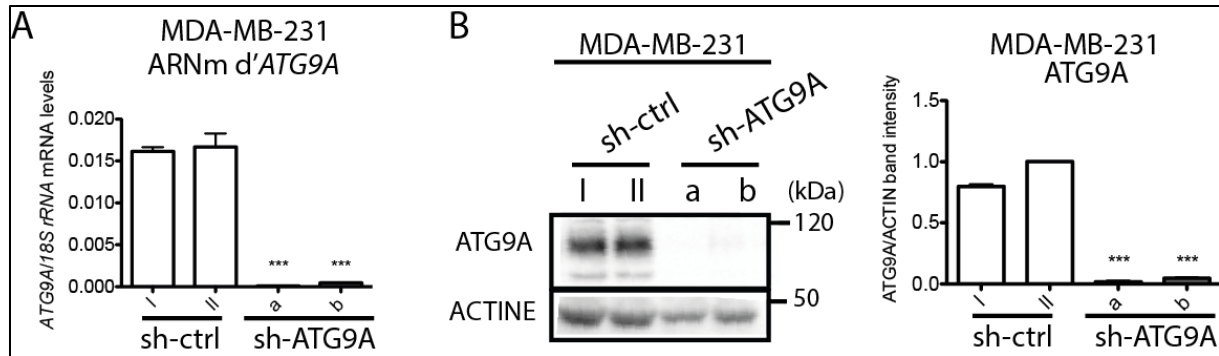


Figure 21 : Modèle d'extinction de l'expression d'ATG9A par sh-ARN dans la lignée MDA-MB-231. (A) Après extraction des ARN par méthode Trizol et leur reverse transcription par l'enzyme M-MLV (*Sigma*), le taux de l'ARNm *ATG9A* a été quantifié dans chaque lignée par qRT-PCR, normalisé par le niveau d'ARNr *18S* (n= 3, duplicats, protocole détaillé dans la **publication II**). (B) Analyse de l'expression d'ATG9A par Western-Blotting. L'image est représentative de 3 expériences indépendantes. Le taux d'ATG9A présenté sur le graphique a été quantifié par mesure de l'intensité des bandes avec le logiciel ImageLab puis normalisé avec la quantité d'ACTINE (protocole détaillé dans la **Publication II**).

Afin de caractériser ce nouveau modèle, nous avons tout d'abord étudié les phénotypes cancéreux de prolifération et d'invasion *in vitro* (**Figure 22**). Nous avons ainsi observé une augmentation significative de la prolifération du clone *sh-ATG9A* « a » et une baisse significative de la prolifération du clone *sh-ATG9A* « b », comparé aux clones contrôles (test MTT). Cependant, ces données n'ont pas été confirmées par le comptage au bleu trypan. Nous n'avons en effet observé aucune différence notable de prolifération, ni d'invasion des cellules *sh-ATG9A* comparé aux cellules contrôles.

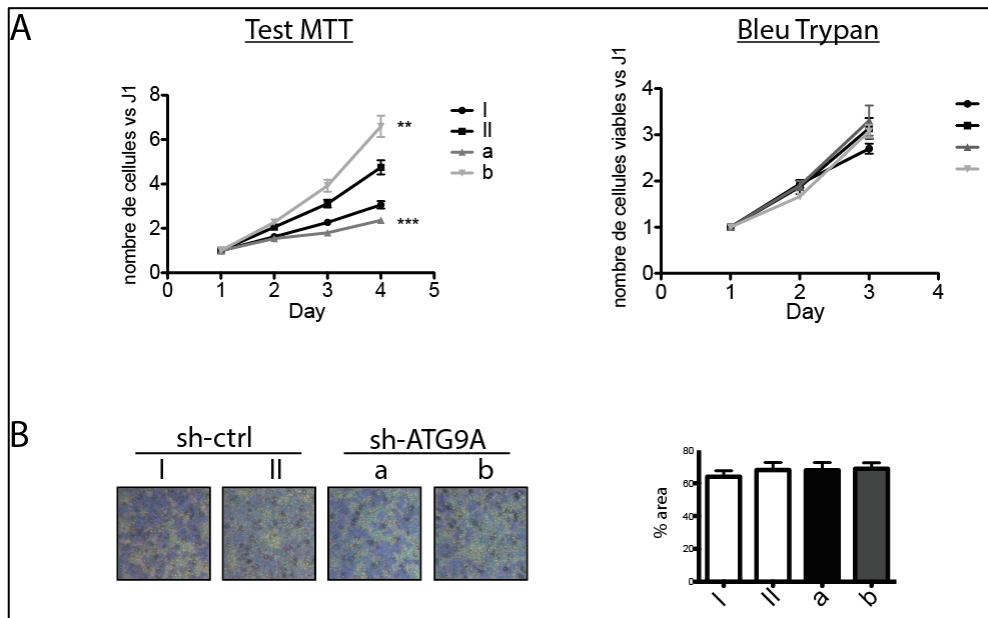


Figure 22 : L'extinction d'ATG9A par sh-ARN dans les cellules MDA-MB-231 ne modifie pas les phénotypes cancéreux *in vitro*. (A) La prolifération a été analysée pendant 4 jours à l'aide d'un test MTT (panneau de gauche, n=3, 16 réplicats) et pendant 3 jours avec des comptages au bleu trypan (panneau de droite) (n=3, duplicats). (B) Un test d'invasion a été réalisé à l'aide de chambres de Boyden recouvertes de matrice extracellulaire (ECM) sur lesquelles ont été ensemencées 40 000 cellules. Après 24h, les cellules ayant migré à travers la membrane ont été fixées et colorées au cristal violet. Les photographies sont représentatives de 3 expériences indépendantes. La densité cellulaire a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (duplicats).

Nous avons alors décidé d'étudier le processus autophagique dans ce modèle, en analysant tout d'abord les niveaux de LC3B-II par Western-Blotting (**Figure 23A**). Nous avons alors observé une diminution de l'accumulation, mais non significative, de LC3B-II dans les clones sh-*ATG9A* (a et b) comparé aux clones contrôles (I et II), qui pourrait être expliquée par une diminution de la synthèse d'autophagosomes et/ou une augmentation de leur dégradation. Nous avons alors réalisé un traitement de nos lignées avec la Bafilomycine A1, un inhibiteur des V-ATPases, qui empêche la fusion autophagosome/lysosome et permet d'inhiber la dégradation des autophagosomes (**Figure 17**), pour déterminer si la diminution de l'accumulation de LC3B-II était dépendante d'une augmentation de la dégradation des autophagosomes. Ce traitement a montré que les clones sh-*ATG9A* (a et b) et sh-contrôles (I et II) répondent tous à la Bafilomycine A1, puisqu'ils présentent tous une augmentation du taux de LC3B-II lorsque les cellules sont traitées avec de la Bafilomycine A1, comparé aux conditions sans traitement, suggérant que la dégradation des autophagosomes n'est pas bloquée dans les cellules sh-*ATG9A*. Cependant, nous observons une plus faible accumulation de LC3B-II lorsque les clones sh-*ATG9A* (a et b) sont traités avec de la Bafilomycine A1, comparé aux clones contrôles (I et II), suggérant qu'une perte d'*ATG9A* dans cette lignée pourrait conduire à une diminution de la formation d'autophagosomes.

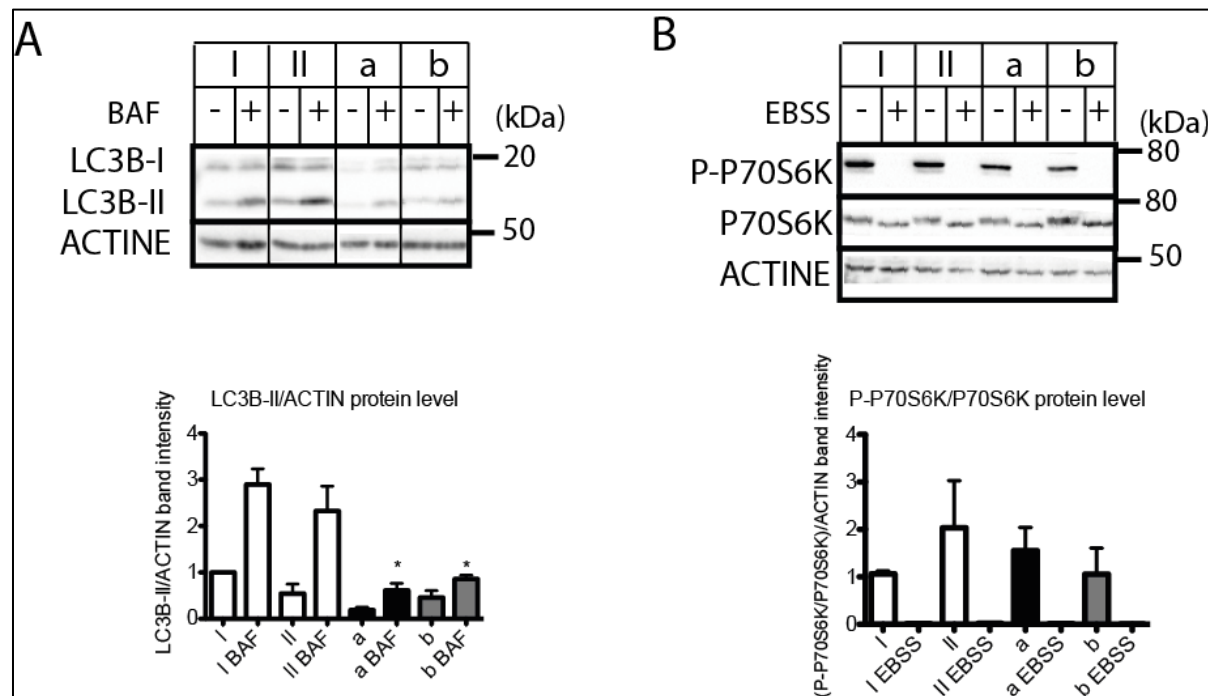


Figure 23 : L'extinction d'*ATG9A* par sh-ARN dans la lignée MDA-MB-231 conduit à une baisse de l'accumulation de LC3B-II, indépendante de l'activité de mTOR. (A) Le taux de LC3B-II a été analysé par Western-Blotting, avant et après 2h de traitement par Bafilomycine A1 (BAF). L'image est représentative de 4 expériences indépendantes. Le graphique présente la quantification de LC3B-II normalisée sur la quantité d'ACTINE (par rapport au clone contrôle I non traité). (B) Le taux de phosphorylation de la kinase P70S6K (P-P70S6K) a été mesuré par Western-Blotting et l'image présentée est représentative de 3 expériences indépendantes. Le graphique montre la quantification de P-P70S6K, normalisée sur la quantité totale de P70S6K et d'ACTINE (Protocoles détaillés dans la **publication II).**

Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé par Western-Blotting la phosphorylation de P70S6K, une cible de la kinase mTOR (**Figure 23B**), mais nous n'avons observé aucune différence significative de phosphorylation de P70S6K entre les clones sh-*ATG9A* et les clones contrôles, suggérant que la diminution d'accumulation de LC3B-II dans les cellules sh-*ATG9A* est indépendante, et probablement en aval, de l'induction de l'autophagie par mTOR.

Puisque nous observons une diminution de l'accumulation de LC3B-II dans les cellules sh-*ATG9A* traitées par Bafilomycine A1, nous nous sommes demandé si l'acidification des lysosomes pouvait être modifiée dans ces cellules. Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé un marquage des vésicules acides à l'aide du composé LysoTracker® (**Figure 24**). Une baisse significative du marquage ($p < 0,0001$; $p \leq 0,0095$) a été observée dans les clones sh-*ATG9A* (a et b) comparé aux clones contrôles I et II, respectivement. Ces données suggèrent que la perte d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-231 conduit à une diminution de l'accumulation de LC3B-II, associée à une baisse de la quantité de vésicules acides.

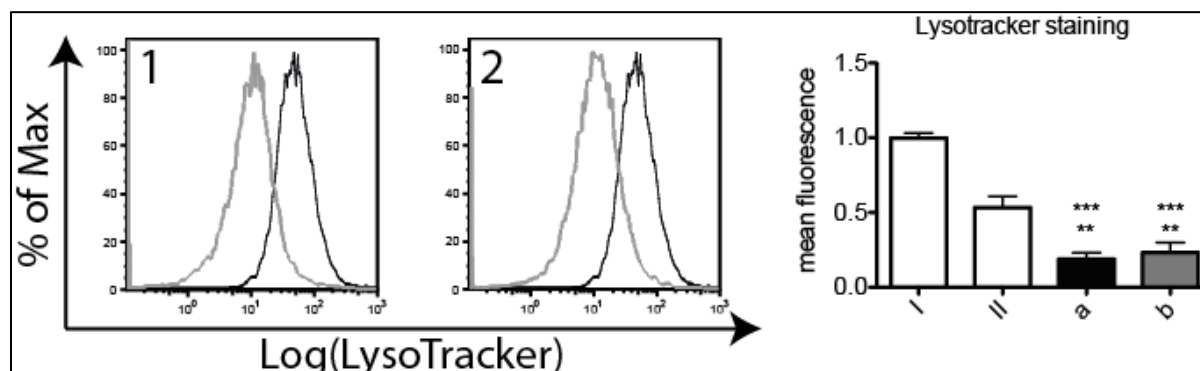


Figure 24 : L'extinction d'*ATG9A* par sh-ARN conduit à une baisse significative de l'acidification des vésicules. Les vésicules acides ont été marquées pendant 30 min à l'aide de LysoTracker®, puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes sont représentatifs de 4 expériences indépendantes et montrent l'intensité de marquage LysoTracker® du clone contrôle I (courbe noire) par rapport aux clones sh-*ATG9A* a et b (courbes grises, histogrammes 1 et 2 respectivement). Le graphique représente la moyenne d'intensité de fluorescence observée par cytométrie en flux (duplicats). L'intensité de marquage a été comparée dans les différents clones à l'aide d'un t-test (Protocole détaillé dans la **publication II**).

L'extinction d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-231 conduit donc à une modification du processus autophagique opposée à celle observée dans la lignée MDA-MB-436. En effet, alors que nous avons observé une accumulation de LC3B-II (en conditions basales et après traitement par Bafilomycine A1) dans la lignée MDA-MB-436 suite à la perte de l'expression d'*ATG9A*, nous n'observons pas de différence significative du taux de LC3B-II en conditions basales dans la lignée MDA-MB-231 mais une diminution du taux de LC3B-II après traitement par Bafilomycine A1 dans la lignée MDA-MB-231. De plus, alors que l'intensité

du marquage des vésicules acides était augmentée dans les MDA-MB-436, la lignée MDA-MB-231 présente une diminution de ce même marquage suite à une perte de l'expression d'ATG9A. Ces résultats surprenants nous ont amené à émettre l'hypothèse que ces deux lignées ne présentaient pas la même dépendance vis à vis du processus autophagique.

Afin de répondre à cette question, nous avons alors décidé d'analyser la quantité d'autophagosomes et d'autophagolysosomes présents dans les lignées sauvages MDA-MB-231 et MDA-MB-436 en transfectant de manière transitoire le plasmide pTF-LC3. Ce plasmide code une protéine de fusion mRFP-GFP-LC3B dont la fluorescence permet de différencier les autophagosomes des autophagolysosomes. En effet, la fluorescence de la GFP est inhibée dans un environnement acide, tel que celui présent dans les lysosomes, alors que la protéine RFP est résistante à l'acidité. Les autophagosomes apparaissent donc sous forme de vésicules jaunes (rouge + vert) alors que les autophagolysosomes apparaissent rouge (Kimura *et al*, 2007) (**Figure 25A**).

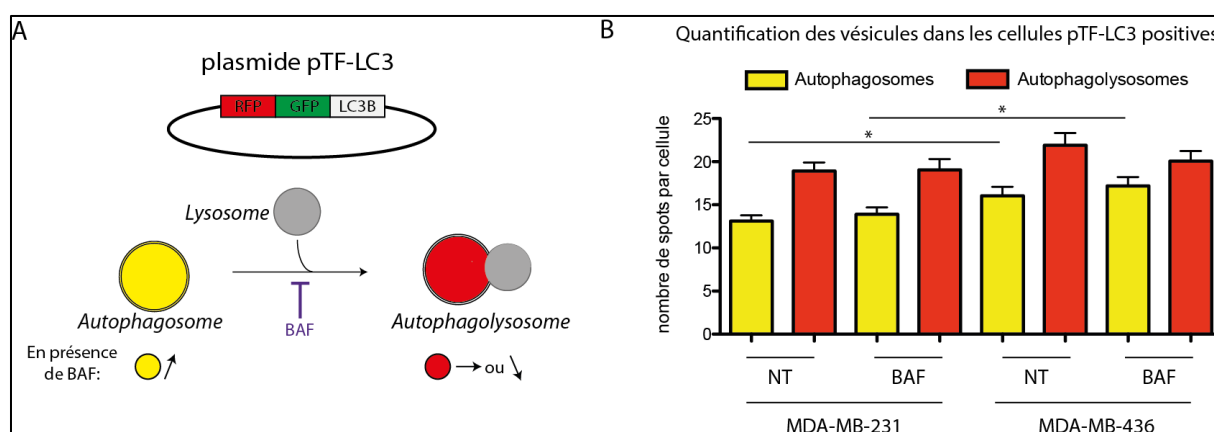


Figure 25 : Quantification des autophagosomes et autophagolysosomes dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436. (A) La protéine de fusion mRFP-GFP-LC3 est codée par le plasmide pTF-LC3. Les autophagosomes apparaissent dans la cellule sous forme de ponctuations jaunes alors que les autophagolysosomes apparaissent rouges. Si l'induction de l'autophagie est élevée dans la lignée testée, un traitement par Bafilomycine A1 (BAF) doit conduire à l'augmentation du nombre d'autophagosomes, avec une baisse ou un taux stable d'autophagolysosomes. (B) Les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 ensemencées sur lamelles de verre (70 000 cellules) ont été transfectées avec 0,5 µg de plasmide pTF-LC3 en utilisant le composé Jetprime (1 µL par puits) en suivant les recommandations du fournisseur. Le jour suivant, après un traitement de 2h avec de la Bafilomycine A1, les cellules ont été fixées à l'aide de PFA 1 % puis montées dans du milieu de montage Vectashield, avant d'être observées et photographiées à l'aide d'un microscope confocal. Le graphique représente le nombre d'autophagosomes (jaune) et d'autophagolysosomes (rouge) comptés dans chaque cellule à l'aide de la macro « green and red puncta colocalization » disponible avec le logiciel ImageJ (n=4, 30 cellules par condition). Les statistiques ont été réalisées à l'aide d'un t-test. NT=Non Traité. BAF=Bafilomycine A1.

L'analyse de la quantité d'autophagosomes (jaunes) a montré une augmentation significative du nombre d'autophagosomes dans les cellules MDA-MB-436 traitées ou non avec de la Bafilomycine A1, comparé à la lignée MDA-MB-231 (p=0,0112 et p=0,0178, respectivement) (**Figure 25B**). Ces données suggèrent que la lignée MDA-MB-436 peut produire une quantité plus importante d'autophagosomes, comparé à la lignée MDA-MB-231.

Cependant, lorsque les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 sont traitées avec de la Bafilomycine A1, nous n’observons pas de différence significative du nombre d’autophagosomes, comparé aux conditions sans traitement. Ces données suggèrent donc que le flux autophagique dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 est faible car le blocage de ce processus dans les étapes tardives ne conduit pas à une accumulation importante d’autophagosomes. Afin de confirmer ou d’infirmier ces hypothèses, nous avons réalisé une quantification du taux de LC3B-II par des expériences de Western-Blotting, en présence ou en absence de Bafilomycine A1 (**Figure 26**).

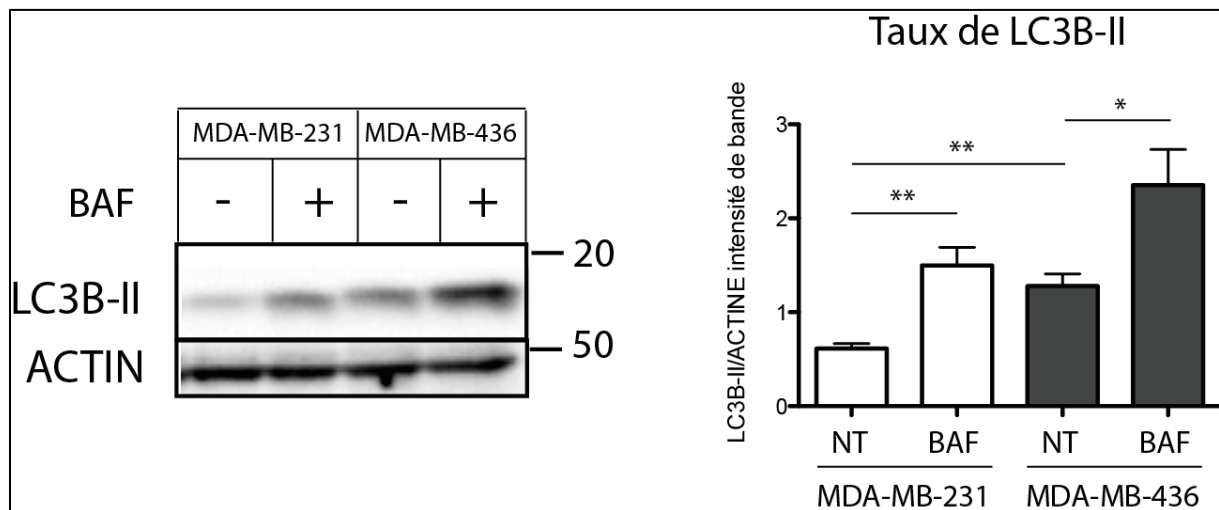


Figure 26 : Quantification du taux de LC3B-II par Western-Blotting dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436. Le taux de LC3B-II des lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 a été analysé par Western-Blotting dans les extraits protéiques des lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436, avec ou sans traitement par Bafilomycine A1 (BAF) pendant 2 h. L’image est représentative de 4 expériences indépendantes. Le graphique à droite représente le taux de LC3B-II, normalisé sur la quantité d’actine (protocole détaillé dans la **Publication II**). L’intensité des bandes a été quantifiée à l’aide du logiciel ImageLab. Un t-test a été réalisé afin de quantifier la différence du taux de LC3B-II dans les conditions présentées. NT=Non Traité. BAF=Bafilomycine A1.

Les résultats ont montré une augmentation significative du taux de LC3B-II dans la lignée MDA-MB-436 comparé aux cellules MDA-MB-231, sans traitement ($p=0,0031$). Ces données sont similaires à ce que nous avons observé après transfection de nos lignées par pTF-LC3. Mais nous observons également une augmentation significative du taux de LC3B-II dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 après traitement par Bafilomycine A1, comparé aux cellules non traitées ($p=0,0045$ et $0,0367$, respectivement), alors que nous n’avons pas observé de différence significative du nombre d’autophagosomes en comparant les mêmes conditions après transfection par pTF-LC3. Ces données suggèrent alors que le flux autophagique dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 a été sous-estimé par l’étude utilisant le pTF-LC3. Cependant, l’analyse des valeurs de flux autophagique entre ces

deux expériences, en calculant le ratio du nombre d'autophagosomes (ou du taux de LC3B-II) en présence et en absence de Bafilomycine A1, montre que le flux autophagique est similaire dans les deux lignées étudiées. Ces données suggèrent que les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 ont un flux autophagique similaire mais que la lignée MDA-MB-436 peut synthétiser un plus grand nombre d'autophagosomes en conditions basales, comparé à la lignée MDA-MB-231.

Une capacité à former un plus grand nombre d'autophagosomes dans la lignée MDA-MB-436 comparé à la lignée MDA-MB-231 pourrait indiquer que la lignée MDA-MB-231 soit moins dépendante du mécanisme autophagique que les cellules MDA-MB-436. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de prolifération cellulaire avec les lignées et les clones présentant une extinction d'*ATG9A*, en présence ou en absence de 3-méthyladénine (3-MA, **Figure 17**), un inhibiteur de la PI3K, qui inhibe les étapes très précoces de l'autophagie (**Figure 27**). Ces données ont montré une baisse de prolifération significative des clones sh-contrôles 1 et 2 dans les MDA-MB-436 lorsqu'elles sont traitées avec du 3-MA ($p \leq 0,0034$ et $p \leq 0,0001$, respectivement). Au contraire, nous n'avons observé aucune différence significative de prolifération des MDA-MB-231 sh-contrôles I et II après traitement similaire au 3-MA. Ces données suggèrent donc bien que les cellules MDA-MB-231 sont moins dépendantes du processus autophagique que les cellules MDA-MB-436 pour proliférer.

De plus, nos données ont montré que le 3-MA a très peu d'effet sur la prolifération des clones sh-*ATG9A* de MDA-MB-436, comparé aux clones contrôles, suggérant que la baisse de prolifération des cellules sh-*ATG9A* observée dans les MDA-MB-436 est étroitement liée aux étapes précoces de l'autophagie. En ce qui concerne la lignée MDA-MB-231, nous n'observons toujours aucune différence significative de la prolifération des clones sh-*ATG9A* après traitement par 3-MA, sauf pour le clone b qui présente une augmentation de la prolifération par test MTT, mais ces données n'ont ensuite pas été confirmées par comptage au bleu Trypan. Ces données suggèrent donc que l'inhibition des étapes précoces de l'autophagie ou l'extinction d'*ATG9A* n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules MDA-MB-231.

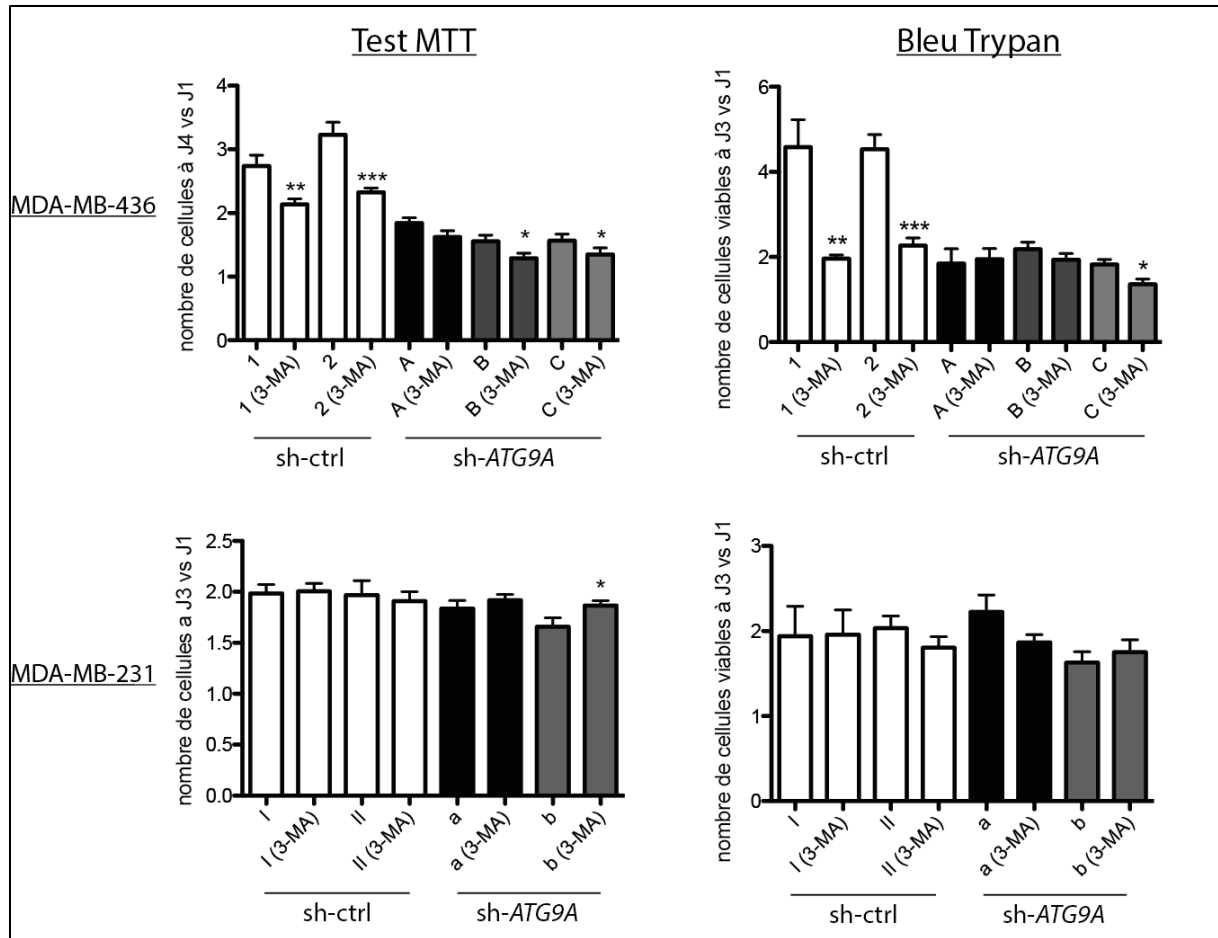


Figure 27 : Le traitement par 3-MA pendant 3 jours inhibe la prolifération des cellules MDA-MB-436, mais pas celle des cellules MDA-MB-231. Le taux de prolifération des cellules MDA-MB-436 (en haut) et MDA-MB-231 (en bas) a été analysé avec un test MTT (panneau de gauche) ou un comptage de cellules viables au bleu trypan (panneau de droite). Les cellules ensemencées (3 000 cellules par puits de plaque 96 puits) ont été traitées le lendemain avec 2,5 mM de 3-MA puis leur taux de prolifération a été évalué tous les jours. Pour le test MTT : n=3 et 6 réplicats et pour le comptage au bleu trypan : n=2 et 4 réplicats.

L'ensemble des données obtenues, résumées dans la **Figure 28**, suggèrent que la protéine autophagique ATG9A pourrait présenter un rôle différent dans les lignées de cancer du sein triple négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-436. En effet, alors que l'extinction de l'expression d'*ATG9A* par sh-ARN dans la lignée MDA-MB-436 conduit à diminution de l'agressivité de ces cellules, nous n'avons observé aucune différence dans la lignée MDA-MB-231. Parallèlement, l'extinction d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-436 conduit à une augmentation de l'accumulation de LC3B-II et de vésicules acides, suggérant une diminution de la dégradation des autophagosomes synthétisés dans la cellule, alors que l'extinction d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-231 conduit à une diminution de l'induction de la formation des autophagosomes, observée *via* une baisse de l'accumulation de LC3B-II après traitement par Bafilomycine A1, associée à une baisse de la quantité de vésicules acides, suggérant que la perte d'*ATG9A* dans cette lignée a un effet inverse sur la quantité

d'autophagosomes et de vésicules acides présentes dans les cellules, comparé aux cellules MDA-MB-436. Cette différence de phénotype pourrait, en partie, être expliquée par le fait que la lignée MDA-MB-231 soit moins dépendante du processus autophagique que la lignée MDA-MB-436. En effet, nos données ont montré par une synthèse d'autophagosomes réduite dans la lignée MDA-MB-231 comparé à la lignée MDA-MB-436, mais également une sensibilité accrue de la lignée MDA-MB-436 au traitement 3-MA, un inhibiteur des étapes précoces de l'autophagie.

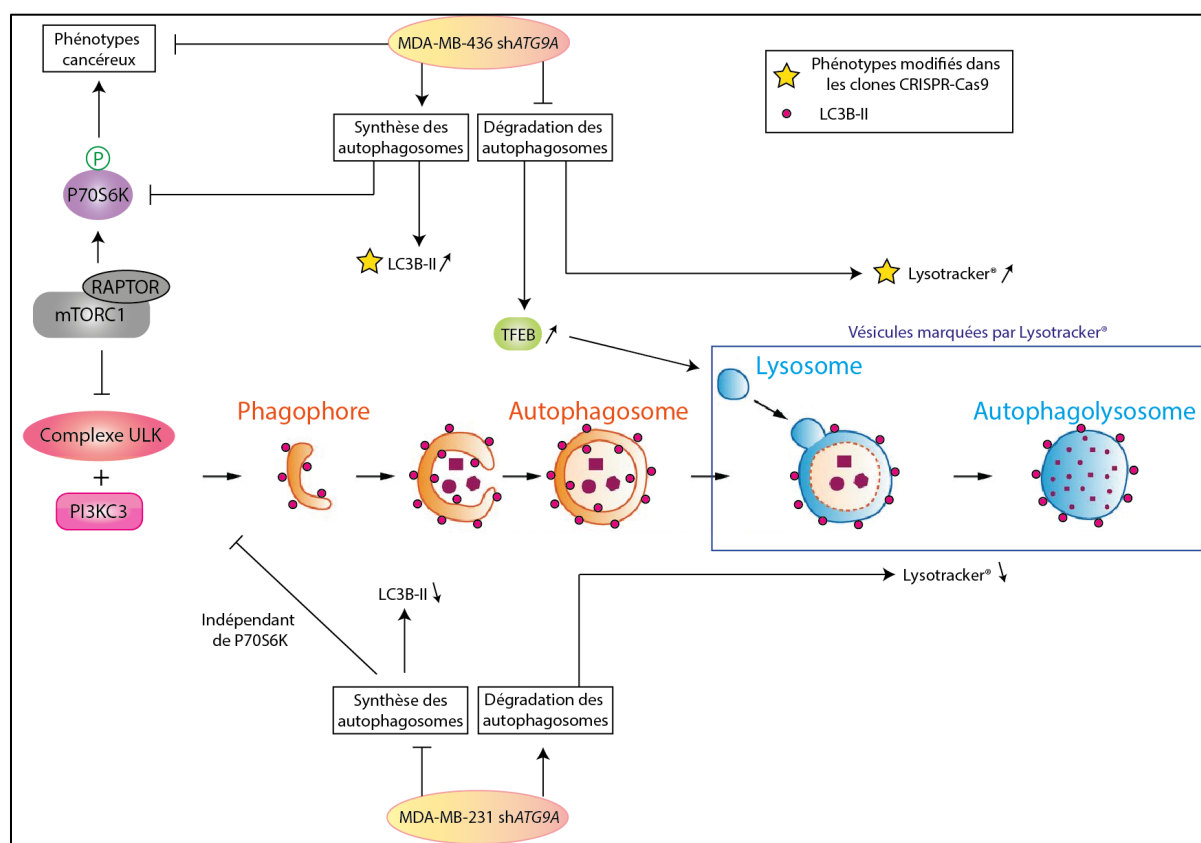


Figure 28: Schéma récapitulatif des modifications de phénotypes induites par la perte de l'expression d'ATG9A dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436. L'extinction d'ATG9A dans la lignée MDA-MB-436 par shARN (haut du schéma) conduit à une diminution de l'agressivité des cellules *in vitro* et *in vivo*. La perte d'ATG9A dans les cellules MDA-MB-436 conduit à une augmentation de l'induction de la synthèse des autophagosomes. En effet, nous observons une augmentation de l'accumulation de LC3B-II dans les cellules shATG9A, corrélée à une diminution de la phosphorylation de P70S6K, une cible de mTOR. Cependant, l'inhibition de la dégradation des autophagosomes dans les cellules shATG9A par la Bafilomycine A1 ne conduit pas à une accumulation de LC3B-II et suggère que la perte d'ATG9A dans cette lignée est associée à une diminution de la dégradation des autophagosomes. Nous observons également une augmentation de l'intensité de marquage Lysotracker® ainsi qu'une augmentation de l'expression de TFEB, un facteur de transcription impliqué dans la biogénèse et l'activité des lysosomes. Ces données suggèrent que la perte d'ATG9A dans la lignée MDA-MB-436 conduit à une accumulation de lysosomes dans la cellule, ne pouvant pas dégrader les autophagosomes formés. La perte de la partie C-terminale d'ATG9A dans les clones CRISPR-Cas9 (étoiles jaunes) conduit à une augmentation de l'accumulation de LC3B-II et du marquage Lysotracker®, suggérant que la partie N-terminale d'ATG9A, à elle seule, permet le maintien des phénotypes cancéreux, la phosphorylation de P70S6K et l'expression de TFEB dans la lignée MDA-MB-436. Les clones MDA-MB-231 shATG9A (bas du schéma) présentent une diminution de la synthèse des autophagosomes, représentée par une diminution de l'accumulation de LC3B-II après un traitement par Bafilomycine A1. Ce processus est cependant indépendant de la phosphorylation de P70S6K. L'extinction de l'expression d'ATG9A dans la lignée MDA-MB-231 ne bloque pas la dégradation des autophagosomes mais conduit à une baisse du marquage Lysotracker®, suggérant que la quantité de vésicules acides contenue dans ces cellules est dépendante de la quantité d'autophagosomes produits.

DISCUSSION

L'ensemble des travaux décrits dans cette thèse a consisté en l'étude de deux gènes de l'autophagie dont l'expression est régulée dans les cancers du sein. En effet, ces travaux ont permis de caractériser les mécanismes épigénétiques régulant l'expression de *GABARAPL1*, un gène dont l'expression est associée à un facteur de bon pronostic dans les cancers du sein (Berthier *et al*, 2010). Nous avons également mis en évidence que l'expression d'*ATG9A* est augmentée dans les cancers du sein triple négatifs et étudié le rôle de cette protéine dans deux lignées de cancer du sein triple négatives. Ces travaux ont permis de montrer que les gènes de l'autophagie peuvent être régulés négativement par des modifications épigénétiques dans les cancers du sein, comme *GABARAPL1* ou *ATG9B* (Hervouet *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2016), mais nous montrons également qu'*ATG9A* peut être régulé de manière positive dans les cancers du sein de type triple négatif, tout comme *LC3B* (Lefort *et al*, 2014) soulignant que la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie n'est pas toujours identique en fonction du sous-type de cancer du sein.

1. Autophagie, épigénétique et cancer

Même si la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie par des modifications épigénétiques reste encore mal décrite, de nombreuses études ont récemment suggéré un lien étroit entre modifications épigénétiques et expression des gènes de l'autophagie dans les cancers. En effet, une hyperméthylation de gènes de l'autophagie, tels que *BECLIN1*, *ULK2*, *BNIP3*, ou encore *ATG16L2*, a été reportée dans les cancers du sein (Li *et al*, 2010), les glioblastomes (Shukla *et al*, 2014), les cancers colorectaux (Murai *et al*, 2005) et les leucémies myéloïdes chroniques (Dunwell *et al*, 2010), respectivement.

L'expression de *GABARAPL1* est généralement diminuée dans les lignées de cancer du sein et la surexpression de cette protéine dans la lignée de cancer du sein MCF-7 conduit à une diminution significative de leur prolifération *in vitro* (Berthier *et al*, 2010) mais conduit également à une diminution de leur capacité à former des tumeurs *in vivo* (Zhang *et al*, 2011). De plus, une forte expression de *GABARAPL1* a été montrée comme associée à un bon pronostic dans les cancers du sein (Berthier *et al*, 2010) et une faible expression de *GABARAPL1* est associée à un faible pronostic dans les carcinomes hépatocellulaires (Liu *et al*, 2014). Les résultats présentés dans la **Publication I** confirment ces données et montrent une corrélation inverse entre l'expression de *GABARAPL1* dans les cancers du sein et le grade des échantillons. Ces données ont également été confirmées dans une publication récente, où les auteurs montrent une diminution de l'expression de *GABARAPL1* dans les cancers du sein

(Lebovitz *et al*, 2015). Puisqu'une étude avait montré que la diminution de l'expression de *BECLIN1* dans les cancers du sein pouvait être associée à une hyperméthylation de son promoteur (Li *et al*, 2010), nous avons émis l'hypothèse que l'expression de *GABARAPL1* pouvait être également régulée dans les cancers du sein par des modifications épigénétiques. Notre étude a confirmé que le promoteur de *GABARAPL1* est effectivement hyperméthylé dans les tissus tumoraux et cellules cancéreuses, alors qu'il l'est très peu dans les tissus non-tumoraux et dans les cellules immortalisées mammaires MCF 10A. Nos résultats ont également montré que le promoteur de *GABARAPL1* est hyperméthylé mais présente également une baisse de l'acétylation de l'histone H3, un lien entre méthylation de l'ADN et désacétylation d'histones ayant été montré auparavant (Sharma *et al*, 2005; Bacon *et al*, 2007).

L'accessibilité des facteurs de transcription au niveau du promoteur étant généralement essentielle pour permettre l'expression du gène, nous avons souhaité déterminer si cela était également le cas dans la régulation de l'expression de *GABARAPL1*. Nos résultats ont montré que l'expression de *GABARAPL1* dans nos modèles est contrôlée par CREB-1 et que l'inhibition pharmacologique de la méthylation de l'ADN ainsi que de la désacétylation des histones facilite le recrutement de CREB-1 au niveau du promoteur de *GABARAPL1*. Nos données sont en accord avec celles de la littérature qui avaient décrit CREB-1 comme un activateur transcriptionnel de l'autophagie (Seok *et al*, 2014). En effet, l'inhibition de l'expression de CREB-1 par siRNA diminue significativement l'expression de gènes de l'autophagie, tels que *ULK1*, *ATG5*, *ATG7* ou *TFEB*, dans des cellules hépatiques en condition de carence en nutriments et son expression a également été associée à un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein (Chhabra *et al*, 2007). Toutes ces données suggèrent que l'effet de CREB-1 sur la régulation de l'expression des gènes de l'autophagie pourrait expliquer en partie son rôle dans les cancers.

L'utilisation de drogues ciblant les modifications épigénétiques a déjà été approuvée par la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) pour le traitement de certains cancers, tels que les lymphomes à cellules T cutanés (vorinostat, despsipeptide), les lymphomes à cellules T périphériques (belinostat), les myélomes multiples (panobinostat) ou encore les syndromes myélodysplasiques (azacytidine et décitabine) (Nervi *et al*, 2015). A ce jour, de nombreux essais cliniques testent l'utilisation de drogues épigénétiques dans le traitement de cancers du sein (**voir Introduction, 2.6**). En effet, un traitement simultané par le 5-aza-CdRdéoxycytidine et la trichostatine A peut induire l'autophagie dans les cellules de cancer

du sein MDA-MB-231 et augmenter l'efficacité anti-tumorale du paclitaxel (Zou *et al*, 2011). Dans la lumière de nos résultats, l'augmentation de l'autophagie pourrait être en partie liée à l'augmentation de l'expression de *GABARAPL1*. De plus, il a été montré que la surexpression de *GABARAPL1* dans les cellules MCF-7 permet d'augmenter le flux autophagique et d'inhiber la croissance tumorale *in vivo* (Zhang *et al*, 2011), ce qui montre que la régulation de l'autophagie est un mécanisme qui joue un rôle important dans l'agressivité des cellules cancéreuses. Nous avons montré que l'expression de *GABARAPL1* est régulée de manière épigénétique dans les cancers du sein, tout comme d'autres gènes *ATGs* tels que *BECLIN1*, *ATG2B*, *ATG4D*, *ATG9A* et *ATG9B* (Li *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2016). Il serait intéressant maintenant de déterminer s'il est possible de ré-induire l'expression de gènes *ATGs* chez des patientes à l'aide de drogues épigénétiques tels que des inhibiteurs de DNMTs ou d'HDACs. Cependant, les inhibiteurs disponibles à ce jour en essai clinique sont généralement à large spectre. En effet, ils permettent d'activer de manière non ciblée l'expression de gènes inhibés par une hyperméthylation de l'ADN mais peuvent donc favoriser la tumorigenèse ou encore augmenter l'agressivité des cellules cancéreuses en réactivant l'expression d'oncogènes ou encore provoquer une instabilité génomique due à l'hypométhylation globale de l'ADN. Par exemple, DNMT1 a été décrite comme étant impliquée dans l'inhibition de l'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Robert *et al*, 2003; Chik & Szyf, 2011) et c'est pourquoi de nombreuses équipes tentent de développer des inhibiteurs spécifiques des complexes protéiques contenant l'enzyme DNMT1 et impliqués spécifiquement dans l'inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, sans inhiber les complexes DNMT1 qui jouent un rôle dans l'inhibition de l'expression d'oncogènes, afin d'éviter les effets secondaires non désirés. DNMT1 peut former de nombreux complexes avec d'autres protéines, comme les complexes DNMT1-CFP1 ou DNMT1-PCNA-UHRF1-G9a (Bostick *et al*, 2007; Sharif *et al*, 2007; Skalnik, 2010). L'inhibition spécifique du complexe DNMT1-PCNA-UHRF1 par un peptide spécifique induit une hypométhylation globale de l'ADN, des aberrations génétiques et la transformation tumorale de cellules du cerveau (astrocytes), du sein ou du poumon (Pacaud *et al*, 2014). Ce complexe n'est donc pas une cible pour le développement d'inhibiteurs spécifiques de complexes DNMT1 dans les cancers. Cependant, il a été montré que le complexe DNMT1-CFP1 peut avoir un effet anti-cancéreux. En effet, la déstabilisation par un peptide spécifique de l'interaction DNMT1-CFP1 permet de diminuer les phénotypes cancéreux *in vitro* et favorise *in vivo* l'efficacité d'une chimiothérapie, le temozolomide, dans un modèle de gliome (Cheray *et al*, 2014). Les mécanismes par lesquels

l'inhibition de cette interaction permet de diminuer les phénotypes cancéreux et l'efficacité du temzolomide restent cependant encore inconnus.

Il serait donc intéressant par la suite de caractériser le(s) complexe(s) qui interviennent dans la régulation épigénétique de l'expression de *GABARAPL1* ainsi que d'autres gènes de l'autophagie dans les cancers du sein. Ceci dans le but de développer des inhibiteurs spécifiques et permettre la réexpression spécifique de ces gènes de l'autophagie chez les patientes présentant une baisse de leur expression. Ainsi, dans une approche de médecine personnalisée, la caractérisation des différents complexes avec des DNMTs pourrait être utilisée pour créer des inhibiteurs spécifiques et cibler les patients qui présentent des modifications de leur méthylome. L'interaction des DNMTs avec leurs partenaires spécifiques pourrait être réalisée de manière routinière chez les patientes, à partir de coupes histologiques provenant de biopsies incluses en paraffine. En effet, la technique P-LISA (*Proximity-Ligation in situ assay*) permet de mesurer et quantifier, par microscopie à fluorescence, l'interaction entre deux protéines distantes de 40 nm maximum, en utilisant deux anticorps primaires d'espèces différentes dirigés contre les protéines d'intérêt. Il a déjà été montré que cette technique peut être utilisée sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine (Aubele *et al*, 2010). La distinction des différents sous-groupes de cancer du sein étant réalisée à partir de marquages immunohistochimiques (**Introduction**, « 1.2 »), il serait assez aisé d'effectuer en parallèle un marquage P-LISA pour cibler les patientes qui présentent des modifications du type d'interaction avec la DNMT recherchée.

2. Gènes de l'autophagie et cancer du sein

Puisque les résultats présentés dans la **Publication I** ont mis en évidence une baisse de l'expression de *GABARAPL1* dans les cancers du sein, de manière proportionnelle au grade et régulée par des modifications épigénétiques, nous nous sommes demandé si d'autres gènes de l'autophagie pouvaient être régulés de manière similaire à *GABARAPL1*. Pour cela, nous avons caractérisé l'expression de six gènes de l'autophagie (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* et *SQSTM1/P62*) dans une nouvelle cohorte de 37 patientes présentant un cancer du sein (**Publication II**, **Figure 1**). D'autres équipes ont déjà montré que l'expression de *BECLIN1* est diminuée dans les cancers du sein (Li *et al*, 2010; Wu *et al*, 2012), et plus particulièrement dans les cancers du sein n'exprimant pas le RE (Tang *et al*, 2015). Nos résultats sont en accord avec ces publications, car nous observons une baisse, même si elle est

non significative, de l'expression de *BECLIN1* chez les patientes de type HER-2 et triple négatif, comparé aux patientes de type luminal A et B.

L'expression de *NIX* avait déjà été analysée chez des patientes atteintes de cancer du sein mais aucune corrélation n'avait été démontrée entre son expression et le grade des patientes (Sowter *et al*, 2003). Dans notre cohorte, nous observons que l'expression de *NIX* semble être plus importante (augmentation non significative) chez les patientes présentant une surexpression d'HER-2 (luminal B et HER-2). Il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie l'implication de *NIX* chez ce type de patientes. En effet, il a été montré que l'expression de *NIX* est significativement induite dans des cellules MCF 10A surexprimant HER-2 et résistantes à l'*anoïkis* (Whelan *et al*, 2013, 2). L'expression d'HER-2 permet de stabiliser le facteur de transcription HIF-1 dans des conditions normoxiques *via* la voie mTOR ou PI3K-AKT (Laughner *et al*, 2001; Li *et al*, 2005) pour permettre l'expression de nombreux gènes, tels que *NIX*, mais également l'élimination de ROS et l'inhibition de la mort induite par l'*anoïkis*, lors du détachement cellulaire (Whelan *et al*, 2013). Ces données suggèrent un rôle possible de *NIX* dans les cellules HER-2⁺ pour induire l'autophagie, afin d'éliminer les ROS, et dans la résistance à l'*anoïkis*. Ceci pourrait expliquer en partie l'augmentation de l'expression de *NIX* chez les patientes HER-2⁺.

Nous avons également observé une légère diminution non significative de l'expression de *SQSTM1/P62* dans les cancers du sein triple négatifs mais aucune autre différence dans les autres sous-types de cancer du sein. Ces données sont en accord avec une publication ayant étudié l'expression de *SQSTM1/P62* dans différentes lignées de cancer du sein mais n'ayant trouvé aucune différence d'expression de ce gène entre les différentes lignées (Thompson *et al*, 2003). Cependant, d'autres études ont montré que le taux de la protéine SQSTM1/P62 est augmenté de manière significative dans les cancers du sein agressifs ou triple négatifs (Rolland *et al*, 2007; Luo *et al*, 2013). Il semblerait donc que l'expression du gène *SQSTM1/P62* ne soit pas corrélée directement à l'augmentation du taux de la protéine dans les cancers du sein et il serait intéressant de confirmer ces données dans notre cohorte, en analysant le taux de SQSTM1/P62 par TMA (*Tissue Microarray*) sur les biopsies incluses en paraffine de nos patientes.

L'analyse du taux de *LC3B* dans notre cohorte nous a permis d'observer une diminution non significative de son expression chez les patientes de type triple négatif. Ces données ne sont pas en accord avec une étude récente ayant montré que l'expression de *LC3B* est augmentée chez les patientes de type triple négatif (Lefort *et al*, 2014). Ces données

contradictoires sont peut-être dues à un nombre de patientes de type triple négatif peu élevé dans notre cohorte.

En ce qui concerne *ATG9B*, une étude récente a montré que son expression est diminuée chez les patientes atteintes de cancer du sein présentant un envahissement ganglionnaire (Zhang *et al*, 2016). Nous n'avons pas pu confirmer ces résultats dans notre cohorte, probablement à cause d'un nombre de patientes présentant un envahissement ganglionnaire trop faible (n=19). Cependant, nous observons également une diminution de l'expression d'*ATG9B*, non significative, chez ce type de patientes, comparé aux patientes n'ayant pas d'envahissement ganglionnaire (données non montrées). Notre analyse en fonction du sous-type de cancer du sein semble montrer que l'expression d'*ATG9B* est diminuée chez les patientes de type HER-2. Il serait intéressant de confirmer ces observations dans une cohorte plus importante car *ATG9B* pourrait, de manière similaire à *NIX*, être régulé par l'expression d'HER-2.

L'étude de l'expression d'*ATG9A* dans notre cohorte de 47 patientes a montré la plus importante augmentation d'expression génique, comparée aux autres gènes de l'autophagie testés. Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons augmenté la taille de notre cohorte et avons ainsi montré une augmentation significative de l'expression d'*ATG9A* chez les patientes triple négatives. L'étude de Zhang *et al.*, citée précédemment, a cependant montré une baisse significative de l'expression d'*ATG9A*, associée à une hyperméthylation de son promoteur, dans des échantillons de cancer du sein comparé au tissu sain adjacent à la tumeur (Zhang *et al*, 2016), mais nous sommes dans l'incapacité de comparer leurs résultats aux nôtres car les auteurs n'ont pas montré l'expression d'*ATG9A* en fonction des différents sous-types de cancer du sein. Cependant, lorsqu'ils étudient l'expression d'*ATG9A* en fonction de l'expression du RE, RP ou HER-2, les auteurs montrent une baisse significative de l'expression d'*ATG9A* uniquement chez les patientes HER-2⁺. Nos données sont donc en accord avec leurs résultats car nous observons également une baisse de l'expression d'*ATG9A*, uniquement chez les patientes présentant une amplification de l'expression d'*HER-2* (luminal B et HER-2). En effet, nous observons une diminution de la moyenne d'expression d'*ATG9A* chez les patientes de type luminal B et HER-2, comparé aux patientes luminal A et triple négatives. Il serait donc intéressant d'étudier la régulation de l'expression d'*ATG9A* par des modifications épigénétiques dans notre cohorte de patientes. Dans ce but, nous avons réalisé une extraction des ADN génomiques provenant d'échantillons de nos patientes de type triple négatif et souhaitons réaliser prochainement une expérience de Methylcollector, afin d'étudier les méthylations du promoteur d'*ATG9A*. Nous projetons également dans le futur

d'analyser les modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur d'*ATG9A*, en réalisant des expériences d'immunoprécipitation de chromatine à partir d'échantillons de nos patientes fixés au formol et inclus en paraffine (Fanelli *et al*, 2011).

Nos données ainsi que celles de Zhang *et al*, suggèrent un rôle d'*ATG9A* chez les patientes exprimant HER-2, ce qui a été démontré dans une étude récente montrant que l'expression de la protéine *ATG9A* est diminuée dans les cellules BT-474 résistantes au trastuzumab (Nunes *et al*, 2016). De plus, un taux élevé de l'expression d'*ATG9A* chez les patientes HER-2⁺ est associé à une durée de vie sans rechute plus longue (Györfy *et al*, 2010). Il semblerait donc que l'expression réduite d'*ATG9A* dans les cellules présentant une amplification d'HER-2 soit également impliquée dans l'agressivité de ces dernières.

Cependant, le rôle d'*ATG9A* dans les cancers du sein triple négatifs semble être différent de celui dans les cancers du sein HER-2 puisque dans notre étude, nous avons montré une augmentation significative de l'expression d'*ATG9A* dans les cancers du sein triple négatifs. De plus, nous avons analysé des données de survie de patientes atteintes de cancer du sein, mises à disposition en ligne avec l'outil « *KM-plotter* », outils permettant d'étudier l'effet de l'expression de plusieurs milliers de gènes sur la survie des patientes (Györfy *et al*, 2010). Cette étude bioinformatique a montré qu'un taux élevé de l'expression d'*ATG9A* chez les patientes triple négatives est associé à une durée de vie sans rechute plus courte (Györfy *et al*, 2010). Il serait intéressant de confirmer ces données dans notre cohorte, mais à ce jour, les données actuelles de suivi ne permettent pas de conclure. En effet, les biopsies utilisées dans notre étude ont été incluses de janvier 2007 à septembre 2014, et pour l'instant, 7 patientes présentent une rechute de la maladie, dont 5 patientes ont une expression d'*ATG9A* élevée, comparé au tissu sain adjacent à la tumeur. Parmi ces 5 patientes, 3 patientes sont de type triple négatif et les 2 autres appartiennent au sous-type luminal B. Il semblerait donc que l'expression élevée d'*ATG9A* chez les patientes de type triple négatif au sein de notre cohorte soit un facteur de mauvais pronostic, comme ce qui a été décrit avec l'analyse bioinformatique citée précédemment (Györfy *et al*, 2010).

L'expression de l'ARNm des gènes n'étant pas toujours corrélée au taux de la protéine dans la cellule, nous avons souhaité étudier le taux de la protéine *ATG9A* dans les tissus provenant des patientes de notre cohorte. Nous avons alors réalisé un TMA sur le tissu sain ou cancéreux provenant de 11 patientes et réalisé un marquage immunohistochimique pour *ATG9A*. Malheureusement, le TMA est encore en cours d'analyse mais nous espérons obtenir très prochainement les résultats. Nous souhaitons également utiliser le TMA réalisé afin

d'étudier l'expression des protéines ATG9B, BECLIN1, LC3B, NIX et P62/SQSTM1 chez nos patientes et comparer nos données obtenues par qRT-PCR chez ces mêmes patientes.

3. *ATG9A* et cancer du sein triple négatif

Afin de caractériser le rôle d'*ATG9A* dans les cancer du sein triple négatifs, nous avons décidé d'étudier son rôle dans les lignées de cancer du sein triple négatives MDA-MB-436 (**Publication II**) et MDA-MB-231 (**Résultats complémentaires**), qui présentent des taux d'expression de la protéine *ATG9A* similaires, mais des taux d'ARNm différents, avec des niveaux très inférieurs dans la lignée MDA-MB-436 comparé aux cellules MDA-MB-231.

3.1 *ATG9A* et lignée MDA-MB-436

Afin d'étudier le rôle d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-436, nous avons mis au point deux modèles d'extinction de l'expression de cette protéine, à l'aide de sh-ARN ou de la technique CRISPR-Cas9. Nous avons ensuite étudié les capacités de prolifération et d'invasion de ces lignées *in vitro* et leur habilité à former des tumeurs *in vivo*. Nous avons ainsi montré que l'extinction d'*ATG9A* par sh-ARN permet de diminuer de manière significative les phénotypes cancéreux testés *in vitro*, mais également de réduire la croissance tumorale *in vivo*, comparé aux cellules exprimant *ATG9A*. Cependant, l'extinction d'*ATG9A* par la technique CRISPR-Cas9, en utilisant un ARN guide ciblant l'exon 5, n'a conduit à aucun résultat significatif. En effet, nous n'avons détecté aucune différence significative de prolifération *in vitro*, ni de capacité à former des tumeurs *in vivo*.

Le séquençage de nos clones CRISPR-Cas9 nous a permis de mettre en évidence qu'une insertion d'une ou deux adénines est présente au niveau de la séquence de l'ADN génomique ciblée par l'ARN guide utilisé pour créer ces clones. L'analyse bio-informatique de cette nouvelle séquence ADN mutée nous a permis de prédire l'expression d'une protéine *ATG9A* tronquée de 68 ou de 98 acides aminés dans nos clones. Ces protéines présentent une extrémité N-terminale identique à la protéine *ATG9A* sauvage, jusqu'à l'acide aminé 63. Cette protéine tronquée d'*ATG9A* serait cytosolique et non plus transmembranaire, car le premier domaine transmembranaire de la protéine *ATG9A* est localisé entre les acides aminés 68 et 88 et que le décalage du cadre de lecture intervenant à partir de l'acide aminé 63 provoque une modification des acides aminés impliqués dans l'ancrage au sein de la membrane. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'ARNm d'*ATG9A* muté synthétisé dans les

clones CRISPR-*ATG9A* et/ou l'extrémité N-terminale cytosolique d'*ATG9A* serait impliquée dans son rôle dans les cancers.

Il serait donc intéressant d'étudier dans le futur, le rôle de la partie N-terminale d'*ATG9A* ainsi que de son ARNm dans la maintenance de l'agressivité des cellules MDA-MB-436. Pour cela, nous projetons d'analyser les phénotypes cancéreux d'autres clones CRISPR-Cas9, déjà obtenus au laboratoire à l'aide d'ARN guides différents, ciblant les exons 8 ou 10 d'*ATG9A*. Nous espérons que ces clones présentent une extinction totale d'*ATG9A* mais il est également possible que ces clones produisent une protéine *ATG9A* également tronquée, puisque l'ARN guide reconnaît une séquence d'ADNg en aval de celle reconnue par le premier ARN guide utilisé, mais qui garderait au moins un domaine transmembranaire. Des données très récentes obtenues au laboratoire ont mis en évidence un clone CRISPR-*ATG9A* après l'utilisation d'un ARN guide ciblant l'exon 8 d'*ATG9A*. Ce clone n'est plus capable de synthétiser l'ARNm d'*ATG9A* ainsi que sa protéine. Des données très préliminaires (n=1) semblent indiquer que ce clone présente une diminution du phénotype de prolifération *in vitro* (test MTT), comparé aux cellules contrôle. Si ces données sont confirmées à l'avenir, ceci corroborerait notre hypothèse selon laquelle l'ARNm d'*ATG9A* ou la protéine tronquée cytosolique qui pourrait être synthétisée dans les clones CRISPR-Cas9 présentés dans cette étude, pourrait avoir un rôle dans la maintenance des phénotypes cancéreux de la lignée MDA-MB-436. Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous planifions de transfecter nos clones CRISPR-Cas9 avec le sh-ARN précédemment utilisé dans notre étude pour confirmer que l'extinction totale de l'expression de l'ARNm *ATG9A* dans ces cellules inhibe les différents phénotypes cancéreux testés. Nous projetons également de construire et de transfecter des plasmides d'expression de la protéine *ATG9A* tronquée dans des cellules MDA-MB-436 sh-*ATG9A* afin d'étudier l'effet des différents domaines présents dans la partie N-terminale d'*ATG9A* sur les phénotypes cancéreux *in vitro* et *in vivo*. En effet, le sh-ARN dont nous disposons reconnaît l'exon 16 de l'ARNm *ATG9A*, et ne ciblerait donc pas l'ARNm de la protéine tronquée. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'ARNm d' *ATG9A* pourrait avoir un rôle sur la maintenance des phénotypes cancéreux de la lignée MDA-MB-436 grâce à son interaction avec des ARN non codants. En effet, il a déjà été décrit que l'ARNm d'*ATG9A* peut être ciblé par le miARN-29a (Kwon *et al*, 2016). Les miARN pouvant cibler plusieurs ARNm, il serait possible que l' ARNm d'*ATG9A* puisse séquestrer un miARN impliqué dans les phénotypes cancéreux de ces cellules. La perte de l'expression de l'ARNm d'*ATG9A* conduirait alors à la libération de ce miARN qui pourrait cibler un autre ARNm, qui serait directement ou indirectement impliqué dans le maintien des phénotypes cancéreux des

cellules MDA-MB-436. D'autre part, la protéine cytosolique tronquée susceptible d'être synthétisée dans les clones CRISPR-*ATG9A* pourrait interagir avec des protéines jouant un rôle dans les phénotypes cancéreux de la lignée MDA-MB-436 (**Figure 29**).

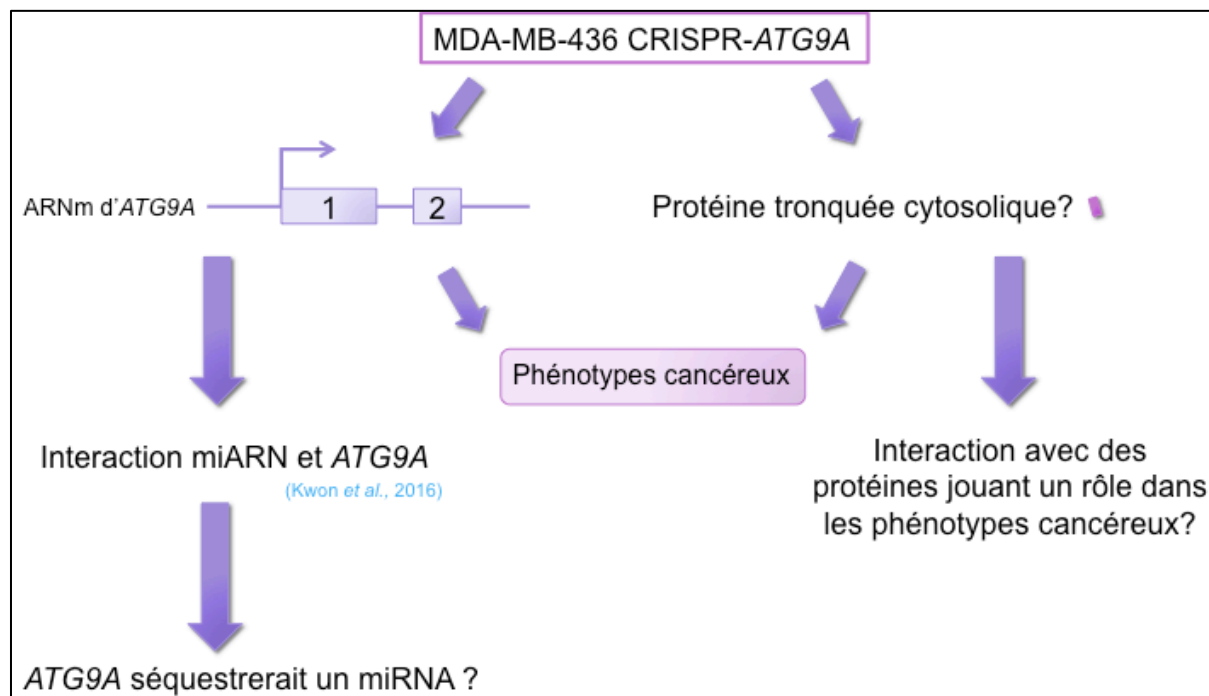


Figure 29: Mécanismes pouvant être impliqués dans le maintien des phénotypes cancéreux dans les cellules CRISPR-*ATG9A*. Les cellules CRISPR-*ATG9A* sont toujours capables de synthétiser l'ARNm d'*ATG9A*, qui pourrait avoir pour rôle d'interagir et séquestrer un ARN non codant qui pourrait avoir un rôle dans le ciblage d'autres ARNm impliqués dans le maintien des phénotypes cancéreux de la lignée MDA-MB-436. D'autre part, une prédiction bioinformatique a suggéré qu'une protéine *ATG9A* tronquée cytosolique pourrait être synthétisée dans les clones CRISPR-*ATG9A*. Cette protéine pourrait interagir avec des protéines intracellulaires jouant un rôle dans les phénotypes cancéreux.

De plus, nous n'excluons pas le fait que la diminution des phénotypes cancéreux observée dans les cellules sh-*ATG9A* puisse être due à des effets secondaires induits par la sélection de clones stables exprimant un sh-ARN. Nous projetons donc de réaliser une transfection avec un plasmide d'expression de la protéine *ATG9A* afin d'étudier si la restauration de l'expression d'*ATG9A* permet de rétablir les phénotypes cancéreux de la lignée MDA-MB-436.

Afin de déterminer si la baisse de l'agressivité des cellules MDA-MB-436 après l'extinction d'*ATG9A* par sh-ARN est liée à son rôle dans l'autophagie, nous avons analysé le taux de la forme lipidée de LC3B, LC3B-II, dans les clones sh-*ATG9A* et CRISPR-Cas9. Nous avons alors observé que l'extinction d'*ATG9A* par sh-ARN ou CRISPR-Cas9 conduit à une augmentation de l'accumulation de LC3B-II comparé aux clones contrôles. Cette augmentation de l'accumulation de LC3B-II peut être due à une augmentation de la synthèse

d'autophagosomes ou à une diminution de leur dégradation (pour une revue, voir Barth *et al*, 2010). Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé des traitements avec de la Bafilomycine A1, un inhibiteur des V-ATPases, qui permet d'inhiber la fusion autophagosome/lysosome. Les résultats n'ont pas montré d'augmentation de la quantité de LC3B-II dans les clones sh-*ATG9A* ou CRISPR-Cas9, comparé aux cellules non traitées, alors que nous observons dans nos clones contrôles une augmentation de la quantité de LC3B-II après traitement par Bafilomycine A1. Ces données suggèrent que l'extinction d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-436 peut conduire à une diminution de la dégradation des autophagosomes et sont en accord avec une publication récente, dans laquelle les auteurs ont réalisé une extinction d'*ATG9A* par si-ARN dans une lignée de cancer du pancréas, et ont montré une accumulation de LC3B-II dans les cellules sans *ATG9A* (Kwon *et al*, 2016). Cependant, des études réalisées sur des cellules embryonnaires de souris (MEFs) ou humaines (HEK293) montrent des résultats opposés. En effet, l'extinction de l'expression d'*ATG9A* dans ces lignées conduit à une baisse de l'accumulation de LC3B-II (Saitoh *et al*, 2009; Orsi *et al*, 2012). Il semblerait donc que le rôle d'*ATG9A* dans le processus autophagique soit différent dans les cellules cancéreuses, comparé aux cellules embryonnaires. En effet, alors que l'autophagie permettrait d'inhiber la tumorigenèse, ce processus pourrait faciliter la survie des cellules cancéreuses (voir **Introduction, 2.4**). En effet, une déficience pour l'autophagie dans des cellules non transformées MEFs n'a pas de rôle sur leur prolifération, suggérant que l'autophagie pourrait seulement avoir un effet sur la prolifération de cellules transformées (Lock *et al*, 2011) et il a été également montré que l'autophagie est essentielle pour permettre une consommation d'oxygène suffisante et le métabolisme de cellules immortalisées de foie transformées par RAS (Guo *et al*, 2011).

Parallèlement, nos données suggèrent que l'ARNm d'*ATG9A* et/ou l'extrémité N-terminale d'*ATG9A* n'est pas impliquée dans l'accumulation de LC3B-II, car nos clones CRISPR-Cas9 ont un phénotype similaire aux clones sh-*ATG9A*. Ces données ne sont pas en accord avec une publication récente réalisée dans des cellules MEFs et montrant que la partie N-terminale d'*ATG9A* (acides aminés 1 à 36) est impliquée dans l'accumulation de LC3B-II (Imai *et al*, 2016). Encore une fois, l'extinction d'*ATG9A* dans les cellules cancéreuses MDA-MB-436 et Panc-1 (Kwon *et al*, 2016) a conduit à un phénotype opposé à ce qui a été observé dans des cellules embryonnaires (Saitoh *et al*, 2009; Orsi *et al*, 2012) et il est donc possible que la partie N-terminale d'*ATG9A* ait un rôle différent dans les cellules transformées.

Puisque nous observons une augmentation de l'accumulation de LC3B-II dans nos modèles d'extinction d'*ATG9A*, qui semblait être due à une baisse de la dégradation des

autophagosomes, nous avons souhaité confirmer ces résultats en analysant la phosphorylation de P70S6K, une cible de mTOR, afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'augmentation de l'induction de l'autophagie dans nos modèles. Nos résultats ont montré une diminution significative de la phosphorylation de P70S6K dans les clones sh-*ATG9A* comparé aux clones contrôles, suggérant une diminution de l'activité de mTOR et donc une augmentation de l'induction de l'autophagie dans les cellules sh-*ATG9A*. L'état de phosphorylation de P70S6K est également corrélé à la prolifération des cellules. En effet, une diminution du statut de la phosphorylation de P70S6K par la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, est associée à une baisse de la prolifération des cellules de cancer du sein dérivées de MCF-7 et résistantes au fulvestrant (Ghayad *et al*, 2008). De plus, l'extinction de l'expression de P70S6K par sh-ARN dans la lignée MDA-MB-231 conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la capacité de ces cellules à migrer *in vitro* (Akar *et al*, 2010). La diminution du taux de phosphorylation de P70S6K est donc en accord avec la diminution de la prolifération et d'invasion *in vitro* des cellules sh-*ATG9A*. Afin de vérifier que la diminution des phénotypes cancéreux des cellules sh-*ATG9A* est liée à une diminution de la phosphorylation de P70S6K, il serait intéressant de poursuivre ces études afin d'étudier le taux de CYCLINE D1 ou encore de la protéine suppresseur de tumeur PDCD4, des cibles de P70S6K (Akar *et al*, 2010).

Cependant, nous n'avons pas observé de différence de phosphorylation de P70S6K dans notre modèle CRISPR-Cas9, comparé aux cellules contrôles. Ces données sont en accord avec les données de prolifération obtenues *in vitro*, ne montrant aucune modification de la prolifération des cellules, mais suggèrent que l'accumulation élevée de LC3B-II lors de l'extinction d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-436 n'est pas corrélée à une modification de l'état de phosphorylation de P70S6K. Il serait donc possible que l'ARNm d'*ATG9A* et/ou la partie N-terminale d'*ATG9A* susceptible d'être synthétisée dans les cellules CRISPR-Cas9 soit responsable de l'induction d'une autophagie indépendante de mTOR. En effet, plusieurs voies indépendantes de mTOR, telles que des voies impliquant l'AMPc, le calcium ou encore l'inositol (Sarkar *et al*, 2005; Williams *et al*, 2008) peuvent réguler l'autophagie. Il serait intéressant d'inhiber ces différentes voies dans nos clones CRISPR-Cas9 afin de déterminer si elles sont impliquées dans l'augmentation du taux de LC3B-II observée dans ces cellules.

Les données obtenues par Western-Blotting sur le taux de LC3B-II ont suggéré que l'extinction d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-436 peut conduire à une diminution de la dégradation des autophagosomes. Les lysosomes étant impliqués dans la dégradation des autophagosomes, nous avons analysé la présence de vésicules acides dans nos modèles, à l'aide d'un marquage LysoTracker[®]. Nos résultats ont montré que l'extinction d'*ATG9A* par

sh-ARN ou CRISPR-Cas9 conduit à une augmentation de l'intensité du marquage, comparé aux clones contrôles. Ces données suggèrent que l'extinction d'ATG9A conduit à l'accumulation de vésicules acides dans les cellules ou à une acidification accrue de ces vésicules. En effet, il a été décrit que les cellules MCF-7 ont un pH cytoplasmique plus acide et un pH au sein des vésicules plus alcalin, comparé à des cellules normales. Cette modification de pH est associée à une dérégulation de la fonction et de l'organisation du Golgi-*trans* (Schindler *et al*, 1996). Il est donc probable que l'extinction de l'expression d'ATG9A, qui est localisée principalement au niveau du Golgi-*trans*, puisse avoir un effet sur le pH des lysosomes. Afin d'observer si l'extinction d'ATG9A peut avoir un effet sur la biogénèse et l'activité des lysosomes, nous avons étudié l'expression de *TFEB*, dont la surexpression permet de réguler le nombre de lysosomes dans la cellule (Settembre *et al*, 2011). Nos résultats ont montré qu'il y avait une augmentation significative de l'expression de *TFEB* dans notre modèle d'extinction par sh-ARN, comparée aux clones contrôles, mais pas dans nos clones CRISPR-ATG9A. Ces données suggèrent que l'accumulation de vésicules acides observée après extinction d'ATG9A dans nos modèles n'est pas directement corrélée à une augmentation de la biogénèse des lysosomes. Il semblerait donc que l'augmentation du marquage LysoTracker[®], après extinction d'ATG9A, soit associée à une augmentation du nombre de vésicules dans la cellule. En effet, l'augmentation de l'accumulation de LC3B-II dans les lignées sh-ATG9A et CRISPR-Cas9 semble être liée à une diminution de la dégradation des autophagosomes par les lysosomes. Il semble donc que l'extinction d'ATG9A dans la lignée MDA-MB-436 inhibe la maturation des autophagosomes ou empêche le transport des autophagosomes matures vers les lysosomes pour induire leur dégradation, provoquant alors une accumulation de lysosomes dans la cellule. Cependant, nous n'avons pas à ce jour de preuve concrète permettant d'éliminer l'une de ces hypothèses. Il est également possible que l'extinction d'ATG9A dans cette lignée conduit à l'induction d'une voie alternative, qui permettrait à cette lignée de survivre. En effet, il est possible que la lignée MDA-MB-436 puisse induire un autre type d'autophagie, nommé LAP (*LC3-associated phagocytosis*). En effet, il a été montré que les membranes de vacuoles entotiques, produites par la capture de cellules vivantes par les cellules épithéliales mammaires MCF 10A, peuvent être associées à LC3 (Florey *et al*, 2011). Comme le processus autophagique conventionnel, la LAP nécessite la présence de BECLIN-1, ATG5 et ATG7 mais ne nécessite pas la présence du complexe d'initiation de l'autophagie, comme la présence d'ULK1, FIP200 et ATG13 (Florey *et al*, 2011; Henault *et al*, 2012). Il est donc possible que les MDA-MB-436 s'adaptent à la perte d'ATG9A par l'induction de LAP, ce qui expliquerait

l'augmentation de la lipidation de LC3 visible par Western-Blotting dans nos clones sh-*ATG9A*. En effet, l'inhibition de l'autophagie par l'inhibiteur des V-ATPases Bafilomycine A1 inhibe à la fois le flux autophagique et la LAP (Florey *et al*, 2015). Ceci expliquerait pourquoi nous n'observons pas d'accumulation de LC3B-II après blocage de l'autophagie par la Bafilomycine A1. La chloroquine, un composé lysomotropique qui provoque une augmentation du pH lysosomal, est un inhibiteur de l'autophagie mais également un inducteur de LAP (Florey *et al*, 2015). Il serait donc intéressant d'analyser la variation du taux de LC3B-II dans nos lignées après traitement par chloroquine afin de vérifier cette hypothèse.

3.2 *ATG9A* et lignée MDA-MB-231

Lors de l'analyse de l'expression des ARNm *ATG9A* dans cinq lignées de cancer du sein triple négatives BT549, MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-436, et MDA-MB-468 (**Figure 19, p135**), nous avons montré que leur expression dans la lignée MDA-MB-436 est significativement inférieure aux autres lignées, même si nous n'observons pas de différence significative de l'expression de la protéine *ATG9A* entre ces lignées, à l'exception de la lignée MDA-MB-157 (**Figure 20, p136**), suggérant que la protéine *ATG9A* est plus stable dans la lignée MDA-MB-436. La lignée MDA-MB-231 étant la seule lignée triple négative testée, présentant une mutation de RAS impliquée dans le maintien de l'agressivité et du phénotype mésenchymateux de ces cellules (Hollestelle *et al*, 2010; Kim *et al*, 2015), nous avons décidé d'étudier le rôle d'*ATG9A* dans cette lignée et comparer nos données avec celles obtenues dans la lignée MDA-MB-436. Nous avons alors mis au point un modèle d'extinction de l'expression d'*ATG9A* dans la lignée MDA-MB-231 à l'aide de l'expression stable du sh-ARN utilisé pour la lignée MDA-MB-436 (**Figure 21, p137**).

La caractérisation des phénotypes cancéreux *in vitro* des cellules sh-*ATG9A* ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence de prolifération ou d'invasion, comparée aux cellules contrôles, suggérant que l'expression d'*ATG9A* dans cette lignée de cancer du sein triple négative n'a pas d'effet sur l'agressivité de ces cellules (**Figure 22, p137**). L'étude du taux de LC3B-II dans les cellules sh-*ATG9A* a cependant montré une baisse de l'accumulation de cette protéine lipidée en présence de Bafilomycine A1, comparé aux cellules contrôles (**Figure 23A, p138**). Ces données suggèrent donc que dans la lignée MDA-MB-231, *ATG9A* a un rôle dans le processus autophagique, mais que ce rôle est différent de celui observé dans la lignée MDA-MB-436. En effet, nous montrons une baisse de l'accumulation de LC3B-II dans les lignées MDA-MB-231 traitées avec de la Bafilomycine A1, suggérant que la perte

d'ATG9A dans cette lignée conduit à une baisse de la synthèse d'autophagosomes. Afin d'étudier si cette baisse de l'accumulation de LC3B-II dans la lignée MDA-MB-231 est associée à une baisse de l'induction de l'autophagie, nous avons analysé le statut de phosphorylation de P70S6K. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de phosphorylation de cette protéine dans les cellules sh-*ATG9A*, comparé aux cellules contrôles (**Figure 23B, p138**). Ces données suggèrent donc que la baisse de l'accumulation de LC3B-II dans les cellules MDA-MB-231 sh-*ATG9A* n'est pas associée à une baisse de l'induction de l'autophagie dépendante de mTOR. En effet, comme décrit précédemment, de nombreuses voies de signalisation peuvent induire l'autophagie de manière indépendante de mTOR (Sarkar *et al*, 2005; Williams *et al*, 2008). Nous avons ensuite effectué un marquage avec du Lysotracker® dans les cellules MDA-MB-231 sh-*ATG9A* et nos résultats ont montré une baisse significative de l'intensité de marquage dans les cellules sh-*ATG9A* comparé aux clones contrôles (**Figure 24, p139**). Ces résultats suggèrent que l'extinction de l'expression d'ATG9A dans la lignée MDA-MB-231 conduit à une baisse de la formation d'autophagosomes, associée à une diminution de l'accumulation de vésicules acides.

L'extinction d'*ATG9A* dans les lignées de cancer du sein triple négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-436 conduit donc à des phénotypes opposés au niveau du processus autophagique mais également sur les phénotypes cancéreux. L'extinction d'*ATG9A* permet de diminuer l'agressivité des cellules MDA-MB-436 alors qu'elle n'a aucun effet sur les cellules MDA-MB-231. Cependant, l'extinction d'*ATG9A* conduit à une modification du processus autophagique dans les deux lignées : alors qu'elle semble inhiber la dégradation des autophagosomes dans la lignée MDA-MB-436, la formation des autophagosomes semble être ralentie dans les cellules MDA-MB-231.

Ces données nous ont donc amené à nous demander si ces deux lignées n'avaient pas une dépendance différente vis à vis du processus autophagique, pour donner des résultats aussi opposés. En effet, il a déjà été décrit que la lignée MDA-MB-231 est très dépendante du glucose pour proliférer (Gupta & Tikoo, 2013) et présente une induction de l'autophagie lors d'une carence en glucose (Palorini *et al*, 2016). Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons analysé le nombre d'autophagosomes et d'autophagolysosomes présents dans les cellules sauvages MDA-MB-231 et MDA-MB-436 et nous avons observé que la lignée MDA-MB-436 produit un nombre significativement plus important d'autophagosomes comparé à la lignée MDA-MB-231 (**Figure 25, p140**). Ces données ont été confirmées par des expériences de Western-Blotting, en quantifiant le taux de LC3B-II (**Figure 26, p141**). De plus, un

traitement par Bafilomycine A1 des lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 a permis de mettre en évidence que ces deux lignées présentent un flux autophagique similaire. Ces données suggèrent que les cellules MDA-MB-436 sont capables de synthétiser un plus grand nombre de vésicules autophagiques que les cellules MDA-MB-231 en conditions basales, mais que ces deux lignées présentent un flux autophagique similaire. Ces données corroborent notre hypothèse selon laquelle les cellules MDA-MB-231 seraient moins dépendantes de l'autophagie, comparées à la lignée MDA-MB-436, car elles sont capables de survivre et proliférer avec un nombre plus faible d'autophagosomes au niveau basal.

Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons testé l'effet de l'inhibition du processus autophagique par le 3-MA, un inhibiteur de la PI3K de classe III, qui inhibe les étapes précoces de l'autophagie, juste avant le recrutement d'ATG9A (**Figure 27, p143**). Nous avons ainsi montré que l'inhibition de l'autophagie par un traitement 3-MA permet de diminuer significativement la prolifération des cellules MDA-MB-436, mais n'a aucun effet sur la lignée MDA-MB-231 dans des conditions identiques. De plus, le traitement 3-MA ne permet pas de potentialiser l'inhibition de la prolifération des cellules MDA-MB-436 sh-*ATG9A*, suggérant ainsi que l'inhibition de la prolifération de ces cellules par extinction de l'expression d'*ATG9A* est dépendante du processus autophagique. Il semble donc que la présence de glucose dans le milieu de culture suffise aux cellules MDA-MB-231 pour continuer à proliférer, alors que la lignée MDA-MB-436 semble être dépendante du processus autophagique pour proliférer. Cette hypothèse est en accord avec une publication qui montre que l'inhibition de l'autophagie par 3-MA permet d'inhiber la prolifération des cellules MDA-MB-231 dans des conditions de carence en glucose (Liu *et al*, 2014). Le processus autophagique semble alors être une alternative pour continuer à proliférer en absence de glucose pour cette lignée. Ceci pourrait ainsi expliquer pourquoi nous obtenons des phénotypes aussi différents après extinction d'*ATG9A* dans ces deux lignées, qui possèdent des génotypes différents bien qu'elles représentent le même sous-type triple négatif.

Les données obtenues lors de l'extinction d'*ATG9A* dans les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436 soulignent que la dépendance au processus autophagique peut être très différente en fonction de la lignée et représentent l'importante variabilité qu'il est possible de rencontrer dans les cancers du sein triple négatifs. En effet, l'extinction d'une protéine autophagique telle qu'*ATG9A* peut inhiber l'agressivité des cellules, comme elle peut n'avoir aucun effet. Le développement d'inhibiteurs spécifiques permettant d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes de l'autophagie chez les patientes atteintes de cancer du sein pourrait

être une bonne cible thérapeutique, à condition de cibler les bonnes patientes. En effet, si des études futures permettent de montrer que l'expression d'*ATG9A* est associée à une dépendance au mécanisme autophagique, son expression pourrait ainsi être utilisée dans le futur comme un marqueur pour l'inclusion de patientes susceptibles de bénéficier de traitements ciblant l'autophagie.

ANNEXES

1. Communications affichées

Septembre 2014

"ATG9A: a new marker for breast cancer?"

Claude-Taupin A, Poillet-Perez L, Algros M.P, Monnier F, Aupet J.B, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Hervouet E.

First Joint Meeting of Nordic, Spanish and French Autophagy Networks (NSF),
Toulouse, France.

ATG9a : A new marker for Breast Cancer ?

Claude-Taupin A.¹, Poillet-Perez L.¹, Algros M.P.², Monnier F.², Aupet J.B.², Despouy G.¹, Delage-Mouroux R.¹, Boyer-Guittaut M.¹, Hervouet E.¹

¹Université de Franche-Comté, EA3922, Estrogènes, Expression Génétique et Pathologies du Système Nerveux Central, U.F.R. Sciences et Techniques, Besançon, France.

²CHU Jean Minjoz, laboratoire d'Anatomie Pathologique, Besançon, France.

Introduction

Autophagy has a double-edge sword in cancer :

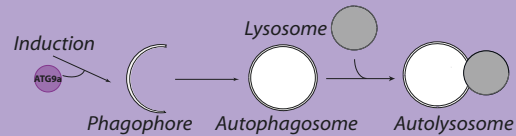
- Limits tumorigenesis by preventing genome damage in response to stress,
- Promotes tumor cell survival, dormancy, regeneration.

ATG9a dynamic trafficking is involved in the initiation of inducible autophagy, and formation of phagophores.

Aim of the study : Determine the expression, role and mechanism of action of ATG9a in Breast Cancer models.

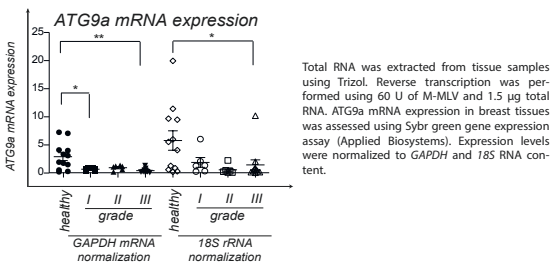
Cell lines : MCF10A, MCF-7, ZR-75, MDA-MB-231, MDA-MB-436.

Cohort : 23 patients : 6 grade I, 6 grade II, 11 grade III, 12 normal breast tissues.



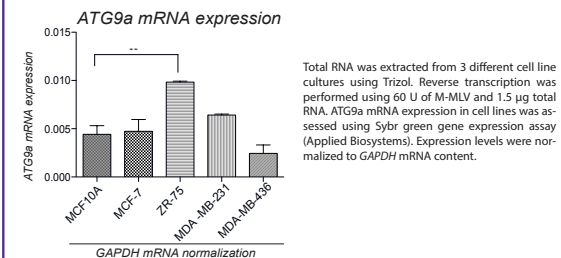
Results

1 ATG9a mRNA expression is decreased in Breast Cancer tumors



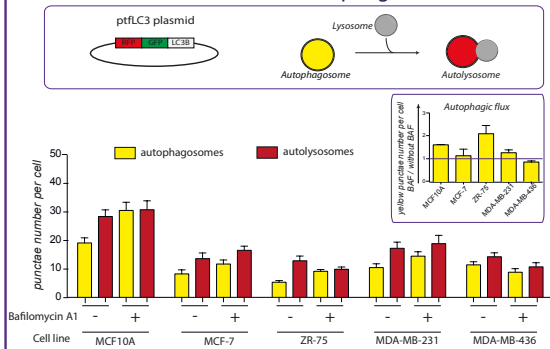
Ongoing... A tissue microarray (TMA) design is in progress to determine ATG9a protein levels in these breast cancer tissues.

2 ATG9a mRNA expression is increased in ZR-75 cell line and seem to be reduced in MDA-MB-436 cells



Ongoing... ATG9a protein levels present the same profile than ATG9a mRNA expression. Further experiments will be performed to reach statistical significance.

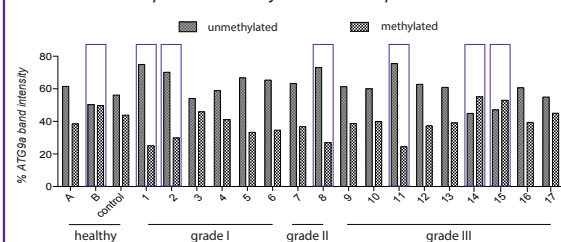
3 ATG9a levels in breast cancer cell lines seem to be correlated to autophagic flux



LC3-II Western Blotting : Same conclusions as ptfLC3 experiments : ZR-75 cells present a higher flux and MDA-MB-436 cells a lower flux than the cue observed in MCF10A cells.

4 ATG9a promoter is partially methylated, but methylation is probably not correlated with ATG9a mRNA expression in breast cancers

ATG9a promoter methylation - semi-quantitative PCR



Ongoing... Quantitative PCR experiments are in progress to reach significance

Conclusion/Perspectives

ATG9a : Correlation between ATG9a protein expression and autophagic flux was observed ; but the methylation status of the gene may not explain ATG9a mRNA expression in our patients cohort. Next, we will study the methylation status of normal adjacent tissue vs tumor tissue and histone modifications status of ATG9a gene.

ATG9a role in breast cancer? Stable transfected MCF-7 and MDA-MB-436 cell lines overexpressing ATG9a are currently designed to evaluate its impact on cancer phenotypes.

Cohort : We are currently analysing 80 more patients to increase our cohort data (gdNA, mRNA, TMA).

Avril 2016

"*ATG9A* mRNA overexpression in breast cancer : a potential new diagnosis marker ? "

**Claude-Taupin A, Monnier F, Algros MP, Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R,
Hervouet E, Boyer-Guittaut M.**

The 2nd UK Autophagy Network meeting,
Edinburgh, UK.

ATG9A mRNA overexpression in breast cancer : a potential new diagnosis marker ?

Claude-Taupin A.¹, Monnier F.², Algros M.P.², Poillet-Perez L.¹, Despouy G.¹, Delage-Mourroux R.¹, Hervouet E.¹, Boyer-Guittaut M.¹

¹Université de Franche-Comté, EA3922, Estrogènes, Expression Génétique et Pathologies du Système Nerveux Central, U.F.R. Sciences et Techniques, Besançon, France.
²CHU Jean Minjoz, laboratoire d'Anatomie Pathologique, Besançon, France.

Introduction

Autophagy is a double-edge sword in cancer :

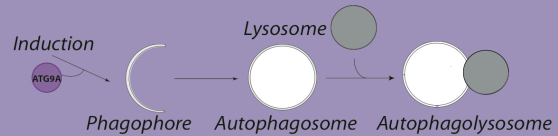
- Limits tumorigenesis by preventing genome damage in response to stress,
- Promotes tumor cell survival, dormancy, regeneration.

ATG9A dynamic trafficking is involved in the initiation of inducible autophagy, and formation of phagophores.

Aim of the study : Characterize the expression, role and mechanism of ATG9A in breast cancer models.

Cohort : 80 patients including 30 Luminal A, 14 Luminal B, 6 HER-2, 30 Triple Negative.

Cell lines : MDA-MB-231 and MDA-MB-436 triple negative breast cancer cell lines.



Results

1 ATG9A mRNA expression is increased in breast cancer tumors

ATG9A mRNA levels in breast cancer subtypes: Ratio Tumor/Healthy Adjacent tissue.

Total RNA was extracted from tissue samples using Trizol. Reverse transcription was performed using 40 U of M-MLV and 1.5 µg total RNA. ATG9A mRNA expression in breast tissues was assessed using Syber green gene expression assay (Applied Biosystems). Expression levels were normalized with the ratio 952/AVNA18S-RNA content. Lum.A.B: Luminal A.B; TN: Triple Negative

Tissue microarray (TMA) in progress to characterize ATG9A protein levels in the breast cancer cohort. Characterization of methylation status of the ATG9A promoter in patient tissues.

Ongoing...

2 ATG9A extinction models in triple negative breast cancer cell lines

Total proteins (20 µg) were separated by SDS-PAGE, before transfer to PVDF membrane. ATG9A levels were normalized to ACTIN content. anti-ATG9A: 17100; Abcam® 128338; anti-β-ACTIN: 1710000; sigma®

Ongoing...

Design of CRISPR/Cas9 KO of ATG9A in the MDA-MB-231 cell line.

3 Opposite effects of ATG9A knock-down on autophagy flux, in breast cancer cells

Cells were treated or not with 10 nM of Bafilomycin A1 (BAF) during 2 hours for basal autophagy study. To induce autophagy, the cells were starved 2 hours in EBS buffer in presence or not of BAF. 20 µg were separated by SDS-PAGE before transfer to PVDF membrane. LC3B-II levels were normalized to ACTIN content.

Preliminary results:
Basal autophagy: Higher LC3B-II accumulation in shATG9A MDA-MB-436
EBS-induced autophagy: Lower LC3B-II accumulation in shATG9A MDA-MB-231

Ongoing...

Perform mRFP-GFP-LC3 puncta formation assay to evaluate autophagosome numbers.
Perform same experiments on CRISPR/Cas9 ATG9A KO in MDA-MB-436 cells.

5 ATG9A knock-down effects on acidic vesicles in breast cancer cells

Cells were stained with 10 nM of LysoTracker® DND-26 during 30 min prior to flow cytometry analysis. The mean fluorescence intensity of sh control cells was compared to shATG9A cells.

Ongoing...

Characterize LAMP1 protein and TFEB transcription factor levels, in order to define the link between ATG9A and the lysosomal compartment.

Conclusion/Perspectives

ATG9A in our breast cancer cohort : ATG9A mRNA is overexpressed in breast tumors compared to healthy adjacent tissue. The methylation status of the gene and the ATG9A protein level (TMA) are currently analyzed in our patient cohort.

ATG9A role in triple negative breast cancer cells? Opposite results were obtained in autophagy flux and lysosomal staining in our different sh-driven knock-down of ATG9A. To complete these data, ATG9A KO by CRISPR/Cas9 in those cells and *in vivo* experiments are in progress. →* Link to different basal autophagy activities?

2. Communications orales

Décembre 2014

"Thèse en 180 secondes"

Claude-Taupin A

Société de Biologie de Besançon,
Besançon, France.

Juin 2015

"L'auto-cannibalisme cellulaire: la clé des thérapies anti-cancéreuses de demain? "

**Claude-Taupin A, Monnier F, Valmary-Degano S, Poillet-Perez L, Delage-Mourroux R,
Hervouet E, Boyer-Guittaut M.**

Forum des Jeunes Chercheurs,
Dijon, France.

Résumé :

Le cancer du sein est la première cause de décès par cancer chez la femme et il touchera 1 femme sur 8 au cours de sa vie. Même si l'on peut se féliciter des progrès réalisés dans le traitement de ces cancers, il reste encore un type de cancer du sein, dit «triple négatif» qui est très agressif et pour qui nous ne disposons que de très peu d'armes thérapeutiques. Le but de ma thèse est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les cancers du sein triple négatifs. Nous avons choisi de cibler nos recherches sur un processus nommé autophagie. Ce mécanisme est utilisé par toutes les cellules de notre organisme et permet de maintenir l'homéostasie cellulaire, en recyclant et éliminant des molécules ou des constituants cellulaires endommagés. Si ce processus est dérégulé, il peut être à l'origine de l'apparition de tumeurs, mais peut également permettre la survie de cellules cancéreuses. En effet, l'autophagie peut leur permettre de dégrader des drogues, elles deviennent ainsi résistantes aux thérapies. Ma thèse a donc pour but de mieux comprendre comment les cellules cancéreuses dérégulent l'autophagie à leur avantage, pour trouver un moyen de les contrôler et les faire devenir à nouveau sensibles aux thérapies anti-cancéreuses.

Octobre 2015

"*ATG9A* mRNA overexpression in breast cancers: a potential new diagnostic marker? "

**Claude-Taupin A, L, Monnien F, Valmary-Degano S, Algros MP, Delage-Mourroux R,
Boyer-Guittaut M, Hervouet E.**

Club Francophone de l'Autophagie,
Lille, France.

Résumé :

Due to the absence of specific therapy for triple negative breast cancers (TNBC), the main goal of the fight against breast cancer (BC) is to find new TNBC therapeutic strategies.

We identified *ATG9A*, a protein involved in autophagosome formation, as a potential marker of TNBC. Indeed, we showed the greatest increase of *ATG9A* mRNA expression in TNBC samples, in a 80 BC patients cohort. We are analyzing epigenetic modifications of the *ATG9A* promoter to characterize its regulation in BC and designed a shRNA-driven inhibition of *ATG9A* in the MDA-MB-231 TNBC cell line to determine its role on cancer phenotypes.

Our results will help understanding the mechanism of action of *ATG9A* in BC, to maybe target *ATG9A* in future TNBC therapies.

3. Publication III

"Proximity Ligation *In situ* Assay is a Powerful Tool to Monitor Specific ATG Protein Interactions following Autophagy Induction. "

Gauthier T, **Claude-Taupin A**, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Hervouet E.

Plos One (2015)

RESEARCH ARTICLE

Proximity Ligation *In situ* Assay is a Powerful Tool to Monitor Specific ATG Protein Interactions following Autophagy Induction

Thierry Gauthier, Aurore Claude-Taupin, Régis Delage-Mourroux, Michaël Boyer-Guittaut, Eric Hervouet*

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

* eric.hervouet@univ-fcomte.fr



OPEN ACCESS

Citation: Gauthier T, Claude-Taupin A, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Hervouet E (2015) Proximity Ligation *In situ* Assay is a Powerful Tool to Monitor Specific ATG Protein Interactions following Autophagy Induction. PLoS ONE 10(6): e0128701. doi:10.1371/journal.pone.0128701

Academic Editor: Maasaki Komatsu, Niigata University School of Medicine, JAPAN

Received: March 17, 2015

Accepted: April 29, 2015

Published: June 2, 2015

Copyright: © 2015 Gauthier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by 1) the University of Franche-Comté, 2) "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (MESR) and fundings from 1) "Région de Franche-Comté" 2013 : EH 2) fellowship of "Région de Franche-Comté" : ACT 3) Conférence de Coordination Interrégional du Grand-Est "Ligue Contre le Cancer" 2014 (#007.Y-2014) : EH. The funders had no role in study design, data collection

Abstract

Macroautophagy is a highly regulated intracellular degradation process which has been extensively studied over the last decade. This pathway has been initially described as a non selective process inducing the degradation of parts of the cytoplasm as well as organelles at random. Nevertheless, over the last few years, new research highlighted the existence of a more selective autophagy pathway specifically recruiting some organelles or aggregates to the autophagosomes in order to induce their degradation. These selective autophagy pathways such as aggrephagy, mitophagy, pexophagy or xenophagy, involve the intervention of a cargo, the material to be degraded, cargo adapters, the molecules allowing the recruitment of the cargo to the autophagosome, and the proteins of the ATG8 family which link the cargo adapters to the autophagosome. One of the main questions which now remain is to develop new techniques and protocols able to discriminate between these different types of induced autophagy. In our work, we studied the possibility to use the P-LISA technique, which has been recently developed to study endogenous *in vivo* protein interactions, as a new technique to characterize the ATG proteins specifically involved in bulk or selective autophagy. In this manuscript, we indeed demonstrate that this technique allows the study of endogenous ATG protein interactions in cells following autophagy induction, but more interestingly that this technique might be used to characterize the ATG proteins involved in selective autophagy.

Introduction

Macroautophagy (hereafter called autophagy) is a catabolic process that leads to the identification, transport and the degradation of cytosolic constituents to the lysosome. More than 40 ATG proteins are related to the initiation, elongation and maturation of a double membrane vesicle, referred as autophagosome, during autophagy. One family has been described to be particularly important for vesicle formation in yeast as well as mammals, the ATG8 family. In mammals, these homologues of the only yeast ATG8 are divided in two subfamilies: the LC3

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

family (LC3A, LC3B, LC3C) required in the early phases of autophagosome formation and the GABARAP family (GABARAP, GEC1/GABARAPL1 (GL1), GATE-16/GABARAPL2) which seems to be more involved in the elongation and closure of autophagosomes.[1] The ATG8 members are synthesized as cytosolic pro-proteins and cleaved by ATG4 enzymes at a C-terminal Glycine to give the mature form of these proteins (form I) before their conjugation onto phospholipids to give the lipidated form of ATG8s (form II). Starvation or hypoxic stress have been described to induce autophagy in a non selective manner and induce the degradation and/or recycling of damaged cellular components in order to regulate cellular homeostasis. More recently, a selective autophagy leading to the specific degradation of intracellular components (ubiquitinated proteins, damaged mitochondria, endoplasmic reticulum, peroxysomes, ribosomes) has been described. This selective process requires the interaction of specific protein cargo adapters with the ATG8 proteins, linked to the membrane of the autophagosome as an anchor point to recruit the cargo into the autophagosome. These cargo adapters, such as SQSTM1/P62, NBR1, NIX/BNIP3L or NDP52/CALCOCO2, all interact with LC3-II *via* a LIR domain (LC3 interacting domain) and with their ligand to be degraded, the cargo using an UBA domain (ubiquitin associated).[2] NIX/BNIP3L is required for the selective degradation of mitochondria, called mitophagy, while NBR1 is indispensable for the selective degradation of peroxisomes, called pexophagy.[3] NDP52 regulates the selective degradation of DICER and AGO2 and thus regulates miRNA activity [4] whereas SQSTM1/P62 is implicated in the selective degradation of ubiquitinated proteins.[5] These different autophagy cargo adapters can then interact with different ATG8 proteins through an AIM WXXL-like motif (ATG8-family interacting motif).[6] This high number of putative interactions between cargo adapters and ATG8s might explain the existence of numerous types of selective autophagy in the cells. This hypothesis has been confirmed by a recent *in vitro* study performed by Berhends and collaborators in order to characterize the cellular autophagy network which revealed a complex network of interactions between autophagy proteins.[7]

Autophagy deregulation has been associated with numerous human pathological disorders even if the mechanism still remains unknown. For example, inactivation or modulation of the expression of several autophagy genes have been reported in cancer cells. Indeed, *BECLIN-1*, *BIF-1* and *UVRAG*, three essential autophagy genes have been classified as tumor suppressor genes and are frequently inactivated in cancer cells leading to the promotion of cell proliferation and aggressiveness.[8,9,10] Defects and mutations in autophagy genes have also been frequently observed in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, or familial Parkinson's disease.[11] Since then, the development of techniques to efficiently monitor autophagy levels in cell and tissue models became a challenge to better characterize autophagy protein expression, function and deregulation in these pathologies. This information will be essential in the future to characterize autophagy levels or autophagy gene and protein expressions as potential diagnostic markers or therapeutic targets.

Several techniques currently used to quantify autophagy levels in cells and tissues are based on the detection of proteins associated to the autophagosomes. Therefore, the ATG8 proteins, and in particular LC3, are the preferential targets for autophagy level quantification. SQSTM1/P62 has also been extensively studied by the autophagy community since this protein was defined as a specific substrate of autophagy.[12] Nevertheless, more recent studies demonstrated that the levels of SQSTM1/P62 are highly regulated by different cellular stresses and cannot be considered anymore as exclusively correlated to autophagy levels. Therefore, western blotting experiments are used to quantify both the LC3-II and LC3-I forms and the amounts of SQSTM1/P62 protein, and *in situ* analysis of GFP-LC3 vesicles in transfected cells are frequently performed. An improved version of the latter approach has been obtained by the expression of a double fusion protein mRFP-GFP-LC3B which allows the identification and

quantification of both autophagosomes (in yellow) and lysosomes (in red). Indeed, it has been described a loss of GFP fluorescence, but not red fluorescence, in acidic compartments (*e.g.* lysosomes).[13] In spite of their highly informative power on autophagosome formation, these techniques are not adapted to study bulk versus selective autophagy. Regarding selective autophagy, researchers concentrate on the study of localization and quantification of cargo adapters such as GFP-P62 or GFP-NBR1.[14] However, due to high levels of aggregation following protein overexpression,[15] variable levels of expression of exogenous GFP or the difficulty to accurately quantify the number of GFP vesicles in transfected cells, in particular when willing to perform co-localization quantification, these models remain difficult and problematic to use. Here, we propose the use of a recently new described technique, called proximity ligation *in situ* assay (P-LISA) (S1 Fig), to monitor endogenous ATG8/cargo adapters interactions to accurately analyze and quantify non selective and selective autophagy in cells.

In this publication, we demonstrate that SQSTM1/LC3B, SQSTM1/GL1, NIX/LC3B and NIX/GL1 interactions can be quantified using P-LISA and are effectively correlated to autophagy levels as shown by the comparison with former techniques. Moreover, our work shows that SQSTM1/LC3B interaction is increased following different autophagy inducers whereas NIX/LC3B and NIX/GL1 interactions are mainly regulated by mitochondria stressors. Altogether, our data describe for the first time, the use of P-LISA in order to easily and efficiently discriminate between different types of autophagy targeting endogenous non overexpressed autophagy proteins.

Material and Methods

Antibodies and reagents

The following antibodies were used: monoclonal anti-P62/SQSTM1 (Santa Cruz, sc-28359; dilutions: IF/P-LISA 1/200, WB 1/1000), polyclonal anti-LC3B (Sigma, L8918; dilutions: IF/P-LISA 1/100, WB 1/3000), polyclonal anti-GABARAPL1 (Proteintech, 11010-AP, dilution: IF/P-LISA 1/100), monoclonal anti-NIX (Santa Cruz, sc-166332; dilution: IF/P-LISA 1/100), polyclonal anti-rabbit-HRP conjugate (P.A.R.I.S, BI2407; dilution: 1/10 000), polyclonal anti-mouse-HRP conjugate (P.A.R.I.S.; dilution: 1/10 000), polyclonal anti-rabbit-Alexa 488 (Life Technologies, BI2413C; dilution 1/1 000), and polyclonal anti-mouse-Alexa 555 (Life Technologies; dilution: 1/1000). Cell culture reagents were purchased from Invitrogen. EBSS (E3024), BafA1 (B1793), Rapa (R8781) and CCCP (C2759) were purchased from Sigma-Aldrich. Rot (AC13237) was purchased from Acros organics.

Cell culture

MDA-MB-436 and MCF-7 cells were obtained from ATCC (HTB-130 and HTB-22). Cells were cultured at 37 C with 5% CO₂ atmosphere in DMEM 1g/L glucose (Dominique Dutscher, L0066) supplemented with 5% SVF (Dominique Dutscher, S1810), 1% penicillin/streptomycin (Dominique Dutscher, L0018) and 0.1% Fungizone (PAA, P11-001). MCF-7 control and MCF-7 overexpressing FLAG-GABARAPL1-6His were available in the laboratory and cultured as described above with the exception of 10% SVF.[16]

Plasmids and transfection

The pGFP-LC3 vector was kindly provided by Dr. Elazar (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). The pEGFP-NIX was kindly provided by Dr. Xiao-Ming Yin[17] and the pGFP-mRFP-LC3B (ptf-LC3) vector was purchased from Addgene (21074). Transient

transfections were performed in 24-well plates using 0.5 µg of DNA and 1 µL of JetPrime reagent (Polyplus Transfection, 114 07) according to manufacturer's protocol.

Western blotting

Cells were scraped, harvested and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X 100, 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). Lysates were sonicated ten times for 5 sec. 40 µg of protein were loaded and separated on a 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before being transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, 162 0177). Membrane was blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline supplemented with Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C under gentle agitation. 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. Signals were acquired using the ChemiDocXRS+ (Biorad, France) and quantified using the Biorad Image Lab software (version 4.0) (Biorad, France).

Immunofluorescence and Proximity Ligation in situ Assay (P-LISA)

Cells were cultured for 24 h on coverslips and then fixed with 4% paraformaldehyde pH 7.4 in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) during 15 min at room temperature. Permeabilization was performed in cold methanol for 20 min at 4 °C.

For immunofluorescence, blocking was realized with 0.1% tween-TBS with 5% BSA for 1 h at 37 °C. Incubations with primary antibodies were performed overnight at 4 °C, and then cells were rinsed 3 times with 0.1% tween-TBS. Incubations with secondary antibodies were performed for 1 h at 37 °C and then cells were rinsed 3 times with 0.1% tween-TBS, stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) and mounted using Vectashield Hardset mounting medium (Vector Laboratories, H-1400).

For P-LISA, all incubations were performed in a humidity chamber and according to the OlinkBioscience's recommendations using Duolink In Situ Detection Reagents Red kit (DUO92008, Sigma-Aldrich, France). Briefly, coverslips were blocked with Blocking solution (82007, Olinkbioscience) for 45 min at 37 °C and then incubated with primary antibodies previously diluted in Antibody diluent (82008, Olinkbioscience) overnight at 4 °C. Coverslips were washed 3 times for 5 min in T-PBS buffer under gentle shaking and then incubated with PLA probes MINUS and PLUS corresponding to the primary antibodies using Duolink In Situ PLA Probe Anti-Goat MINUS (DUO92006, Sigma-Aldrich, France), Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse PLUS (DUO92001, Sigma-Aldrich, France), Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS (DUO92004, Sigma-Aldrich, France) and Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit MINUS (DUO92005, Sigma-Aldrich, France) for 2 h at 37 °C. Then, coverslips were washed 3 times for 5 min in T-PBS buffer under gentle shaking and then incubated with a DNA ligase previously diluted in Ligation buffer for 30 min at 37 °C. Coverslips were washed 3 times for 5 min in T-PBS buffer under gentle shaking and incubated with a DNA polymerase previously diluted in Amplification buffer for 90 min at 37 °C. Finally, coverslips were rinsed for 10 min in presence of DAPI under gentle shaking and then washed 2 min with (0.02X, 0.2X, or 2X (30 mM sodium citrate; 300 mM sodium chloride) SCC buffer, and then 2 min in 70% ethanol. Dried coverslips were mounted with Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, H-1000). Fluorescence was visualized with an Olympus IX81 confocal microscope (Olympus, France) and pictures acquisition was realized using a DP75 camera.

Finally, immunofluorescence images were analyzed using the ImageJ software while P-LISA images were analyzed using the BlobFinder software available for download from www.cb.uu.se/~amin/BlobFinder. Interactions were quantified by counting the number of dots per cell as well as the intensity of signal per dot. An increase of intensity is the consequence of a concentration of interactions in the same cellular dots. [18] In the different figures, each bar (Mean \pm SEM) represents the mean obtained from the quantification of signals observed in about 200 cells chosen randomly in 5 different fields from 3 independent experiments.

Statistical Analysis

Differences between means were analyzed using t-test with GraphPad Prism 5 software. Co-localization experiments were analyzed using Pearson and the Image J (plug-in Coloc-2) software. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) and **** ($p < 0.0001$)

Results

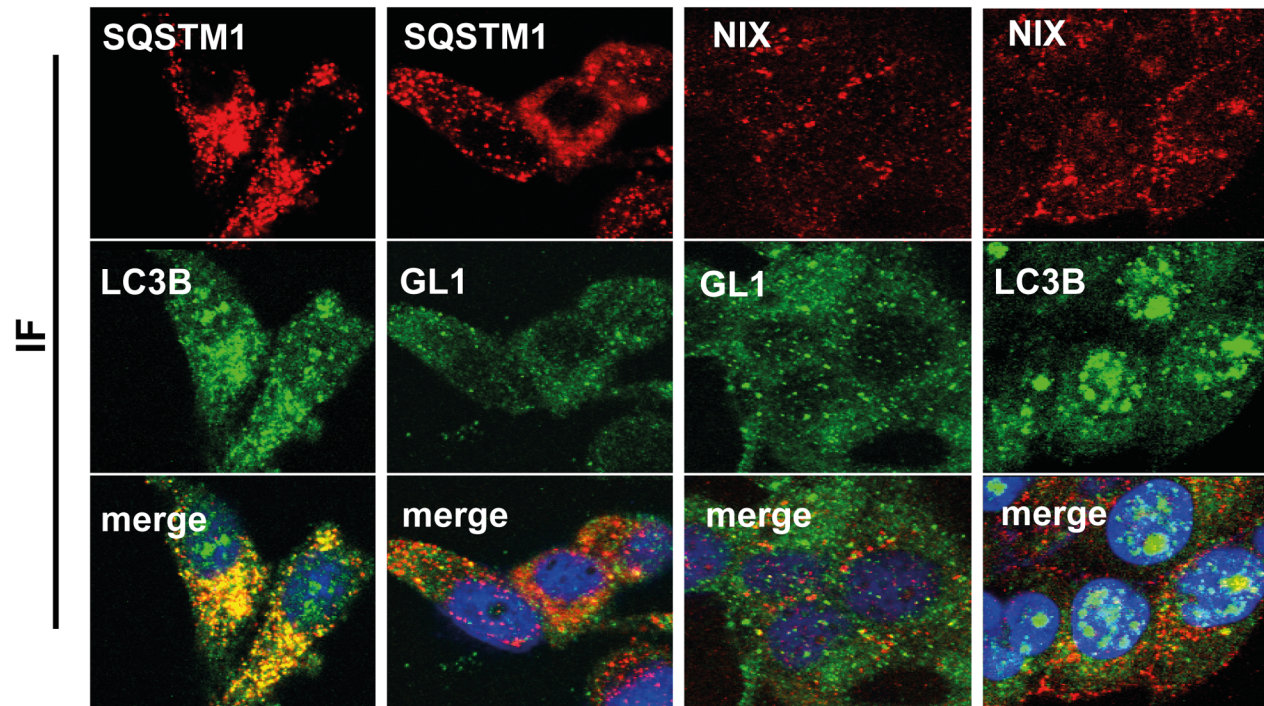
P-LISA can be used for the detection of autophagy protein interactions in breast cancer cell models

Previous reports described the importance of multiple interactions between autophagy proteins during the course of autophagosome formation. [2,5,6,7,19] Moreover, recent data suggested that specific interactions between members of the ATG8 family (LC3B, GABARAP or GABARAPL1) and cargo adapters, such as SQSTM1/P62 or NIX, were essential to induce the selective degradation of target proteins or organelles during a new process called selective autophagy. For example, SQSTM1/LC3B interaction has been previously reported in cells overexpressing GFP-LC3B, and the authors demonstrated that this interaction favored the SQSTM1 localization in autophagosomes. [19,20,21] Moreover, additional interactions of SQSTM1 with other ATG8 proteins (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2) have been reported in ATG8-overexpressing cell models [7]. Unfortunately, these data were mostly observed in transfected cells and it is known that overexpression of exogenous proteins might lead to non specific interactions or the formation of GFP aggregates as already pointed out. [15] Therefore, we decided to develop a specific P-LISA protocol to quantify *in cellulo* endogenous autophagy protein interactions.

P-LISA is a multi-step technique leading to the detection of specific fluorescent dots linked to close proximity protein interactions (range below 40 nm) (S1 Fig). This technique is based on the use of two different primary antibodies of different species which are specific of two proteins supposed to interact in the cells. The advantage of this technique is the detection of endogenous proteins in the cellular context without the need of overexpression. Moreover, the maximal distance between the two proteins to get a signal should not exceed 40 nm, a distance which is below the sensitivity of confocal microscopy used for co-localization experiments.

First, we compared the possibility to use P-LISA in breast cancer cells (MDA-MB-436) to detect the interaction between LC3B (an ATG8 family member) and SQSTM1 (a cargo adapter). Immunofluorescence (IF) experiments confirmed the expression of these proteins and their partial co-localization in the MDA-MB-436 cells (Fig 1A left panel). However, co-localization of proteins detected by IF does not necessarily mean interaction. Moreover, co-localization quantification of ATG proteins in immunostained cells is difficult to analyze due to the large distribution of these proteins in the cell. Since our LC3 antibody seemed to present a rather low specificity and induced the detection of non specific nuclear signals, which has already been described by others, [22] we wondered whether P-LISA would give a

A



B

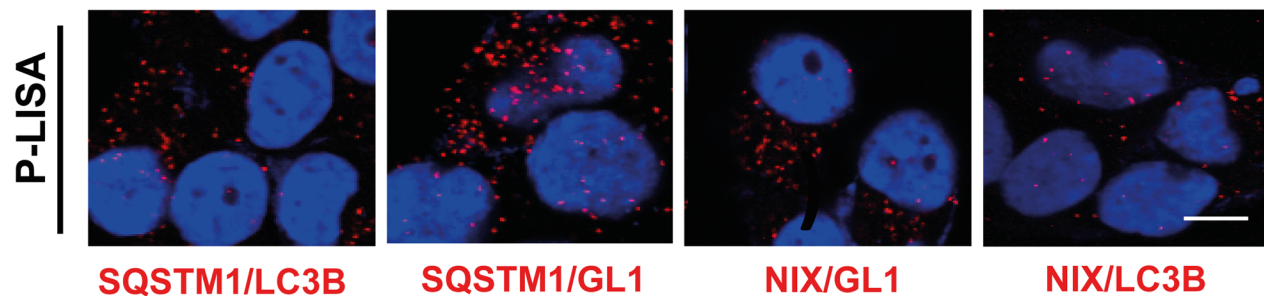


Fig 1. Detection of SQSTM1/LC3B, SQSTM1/GL1, NIX/GL1 and NIX/LC3B interactions by P-LISA. (A) MDA-MB-436 cells were cultured for 24 h at 37 C and 5% CO₂, fixed, permeabilized, blocked with 5% BSA, incubated with rabbit anti-LC3B, rabbit anti-GL1, mouse anti-SQSTM1 or/and mouse anti-NIX antibodies overnight at 4 C and then with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit and an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse, respectively, for 1 h. The cells were then analyzed using a confocal microscope. (B) For P-LISA, the protocol was performed according to the manufacturer's recommendations using the same antibodies as described above. Nuclei were stained with DAPI. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random. Scale bars: 20µm.

doi:10.1371/journal.pone.0128701.g001

more specific result in our model. Therefore, we developed a specific P-LISA protocol to quantify *in cellulo* endogenous SQSTM1 and LC3B interactions. During these P-LISA experiments, using two specific primary antibodies directed against SQSTM1 and LC3B, we detected quantifiable specific P-LISA dots corresponding to the interaction of endogenous LC3B and SQSTM1 in MDA-MB-436 cells without the need to overexpress these proteins (Fig 1B left panel). We then asked whether this protocol could be used for the study of other

autophagy-related protein interactions and therefore targeted the interactions between SQSTM1 and GABARAPL1 (GL1, another ATG8 family member) or interactions of a second cargo adapter NIX with LC3B or GL1 in MDA-MB-436 cells (Fig 1). Immunofluorescence experiments confirmed the expression of NIX and LC3 proteins in our models and their partial co-localization in MDA-MB-436 cells (Fig 1A). Then, the use of NIX/GL1 P-LISA revealed the presence of dots (a mean of 11.6 dots/cell) in MDA-MB-436 which quantification was facilitated thanks to the specificity of P-LISA staining. We obtained similar results regarding the interaction between LC3B and NIX (a mean of 18.9 dots/cell) (Fig 1B).

To confirm that these signals observed in MDA-MB-436 cells were indeed specific, we performed several technical controls (Fig 2). First, we performed P-LISA controls without primary antibodies (Fig 2A left panel) or using one secondary PLA probe antibody incompatible with the primary antibodies used. As expected, both controls did not produce any P-LISA signals in the cells (Fig 2A). Second, we used siRNA targeting *LC3B* expression in our models (Fig 2B top panel). We also observed that the specific *LC3B* siRNA also strongly decreased the number of SQSTM1/LC3B P-LISA fluorescent dots, data which demonstrated the specificity of the technique (Fig 2B bottom panel). To confirm these data, we performed a control using murine cells since the murine SQSTM1 protein does not contain the human epitope recognized by the anti-SQSTM1 antibody used in our P-LISA experiments. Once again, we confirmed the specificity of our technique since we observed no SQSTM1/LC3B P-LISA signal in murine cells but showed the restoration of P-LISA signals when these cells were transfected with a vector coding the human HA-SQSTM1 protein (Fig 2C). At last, we performed NIX/GL1 P-LISA in MDA-MB-436 cells stably expressing a shRNA targeting *GABARAPL1*. [16] Absence of GL1 in these cells was confirmed using western blotting (Fig 2D). Our data confirmed that the cells which did not express GL1 following shRNA expression did not present any P-LISA staining (Fig 2E).

Since a decreased expression of GL1, a member of the ATG8 family, has been frequently observed in breast cancer (BC) cells, we decided to use the MCF-7 cell line, which has been described to present an undetectable expression of GL1 in western blotting and a weak basal signal in IF, to validate the specificity of the SQSTM1/GL1 and NIX/GL1 P-LISA (Fig 3). Western blotting (Fig 3A) and immunofluorescence experiments (Fig 3B) indeed confirmed the low GL1 expression in MCF-7 control cells (stably transfected with an empty vector) and the presence of this protein in MCF-7 cells stably overexpressing FLAG-GL1-6His, as previously described. [16] These data also showed an increase in the co-localization of GL1 and SQSTM1 in overexpressing cells compared to non-expressing cells (Fig 3B top panel). Regarding SQSTM1/GL1 P-LISA staining, as expected, few fluorescent dots were observed in MCF-7 control cells (3.9 dots per cell) while a significant increase of SQSTM1/GL1 P-LISA signals was quantified in MCF-7 stably overexpressing FLAG-GL1-6His (15.4 dots per cell) ($p < 0.0001$, Fig 3B bottom panel). MCF-7 cells stably overexpressing FLAG-GL1-6His cells expressed a very low level of NIX protein associated with a low signal of NIX/GL1 P-LISA signals in these cells (Fig 3C). Nevertheless, the transfection of the pEGFP-NIX vector and the overexpression of GFP-NIX in these cells, increased NIX/GL1 P-LISA signals confirming that these interactions are NIX-dependent (Fig 3C).

Altogether, these data demonstrated the feasibility and the specificity of P-LISA to detect specific autophagy protein interactions in BC cell models. Moreover, we showed that, in our models, the quantification of P-LISA signals is easier and more accurate than the quantification of co-localization signals in IF experiments.

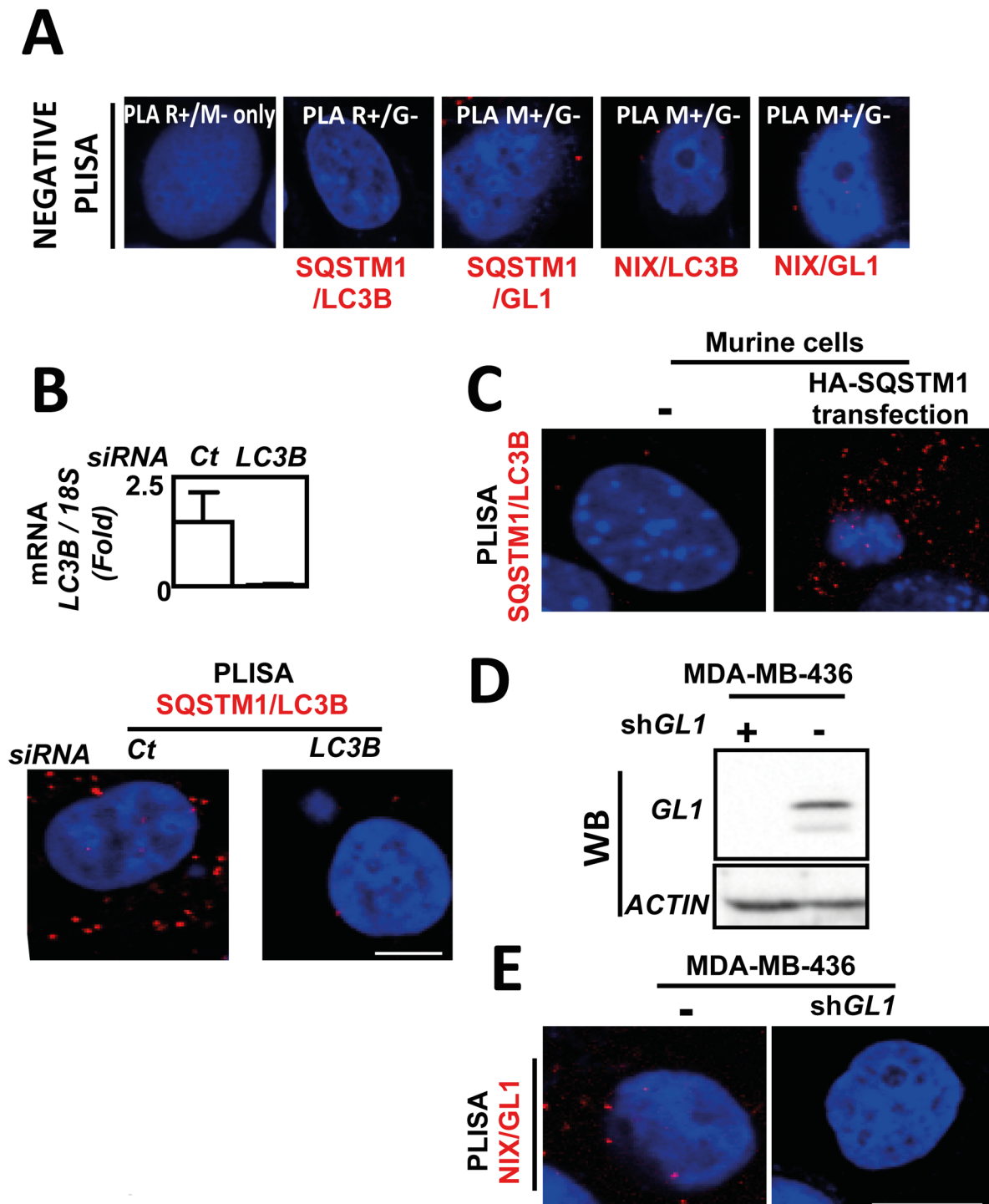


Fig 2. Technical controls demonstrating the specificity of P-LISA signals. (A) MDA-MB-436 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. P-LISA were performed according to the manufacturer's recommendations. No primary antibodies were added before performing P-LISA with PLA R+ (anti-rabbit) and PLA M- (anti-mouse) (left panel); P-LISA SQSTM1/LC3B was also performed with PLA R+ (anti-rabbit) against LC3B and with PLA G- (anti-goat) unable to recognize SQSTM1 (left panel). Similar controls were performed for P-LISA SQSTM1/GL1, P-LISA LC3B/NIX and P-LISA GL1/NIX. (B) Quantification of LC3B mRNA expression in MDA-MB-436 cells following LC3B siRNA transfection analyzed using qRT-PCR (top panel). Quantification of SQSTM1/LC3B interactions detected by P-LISA in MDA-MB-436 cells transfected or not with LC3B siRNA (bottom panel) according to the manufacturer's recommendations using rabbit anti-LC3B and mouse anti-SQSTM1 antibodies. (C) Absence of SQSTM1/LC3B P-LISA signals in murine cells since the anti-SQSTM1 antibody is specific of the human SQSTM1 protein and restoration of P-LISA signals when these cells were transfected with a vector coding the human HA-SQSTM1 protein. (D) Absence of GL1 protein was validated using western blotting in MDA-MB-436 cells expressing or not a GABARAP1 shRNA (E) Quantification of

NIX/GL1 interactions was performed by P-LISA in MDA-MB-436 cells expressing or not a *GABARAPL1* shRNA using rabbit anti-GL1 and mouse anti-NIX antibodies.

doi:10.1371/journal.pone.0128701.g002

Quantification of SQSTM1/LC3B, SQSTM1/GL1, NIX/LC3B and NIX/GL1 specific interactions using P-LISA following autophagy flux inhibition

In order to analyze whether the autophagy protein interactions could be detected following autophagy induction using P-LISA and whether they were indeed associated to the formation of autophagosomes, we asked whether the signals obtained with SQSTM1/LC3B P-LISA, SQSTM1/GL1 P-LISA, NIX/LC3B P-LISA, or NIX/GL1 P-LISA co-localized with the fusion protein GFP-LC3 overexpressed in MDA-MB-436 cells. As expected, GFP-LC3 puncta significantly colocalized with all four P-LISA signals suggesting that these signals were related to autophagosomes (Fig 4A–4D). These conclusions were confirmed by the significant correlation index determined between the number of GFP-LC3B puncta and the SQSTM1/LC3B P-LISA signals ($p = 0.025$) (Fig 4A). However, due to the overexpression of GFP-LC3B in transfected cells, the strong increase of SQSTM1/LC3B P-LISA signals linked to large puncta in the cells was influenced by GFP-LC3 overexpression and not only by autophagy induction since expression of GFP-LC3B significantly increased SQSTM1/LC3B P-LISA signals in both the absence or presence of EBSS/BafA1 treatment in MDA-MB-436 cells (S2 Fig). Indeed, it has already been demonstrated that the overexpression of LC3B can induce the formation of cellular aggregates which could also include SQSTM1.[15] Taken together, these observations suggest that SQSTM1/LC3B P-LISA quantification of endogenous proteins interactions may be more accurate than overexpressed GFP-LC3B quantification for autophagy flux analysis. Similar experiments performed using SQSTM1/GL1 P-LISA revealed a very strong correlation between the number of GFP-LC3B vesicles and P-LISA signals ($p < 0.0001$) (Fig 4B). These experiments were also performed using NIX/LC3B P-LISA or NIX/GL1 P-LISA and, once more, a significant co-localization between GFP-LC3-positive puncta and P-LISA signals were observed (Fig 4C, $p = 0.016$ and Fig 4D, $p = 0.005$).

P-LISA can be used to monitor selective autophagy

Following the demonstration that P-LISA can quantify differences in autophagosome formation, we next asked whether this technique might also help discriminating between responses to different autophagy inducers. Indeed, until now, none of the current techniques used to quantify autophagy may specifically and undoubtedly discriminate between non selective and selective autophagy. To do so, we decided to use P-LISA protocols including cargo adapters (such as NIX or SQSTM1) and ATG8 proteins (LC3B or GABARAPL1) since these proteins have been described to play an essential role in autophagy selectivity.[2,5]

In this assay, we treated MDA-MB-436 cells, described to express endogenous SQSTM1, LC3B, NIX and GL1, with different modulators of autophagy: i) rapamycin (Rapa), an autophagy inducer inhibiting mTOR activity; ii) rotenone (Rot), an inhibitor of oxidative phosphorylation complex I or, iii) CCCP (carbonyl cyanide *m*-chloro-phenyl hydrazone), an uncoupling agent. The two latter chemicals have been described to induce a mitochondrial stress and mitophagy.[23,24,25] As expected, using western-blotting, an increase of the autophagosome-linked LC3B form (LC3B-II) was observed following treatment with Rapa, BafA1, CQ, Rot and CCCP but we were unable to detect any significant differences in autophagy induction following these treatments using this technique (S3 Fig). To determine whether SQSTM1/LC3B, SQSTM1/GL1, NIX/LC3B and NIX/GL1 interactions are differentially modulated by these treatments,

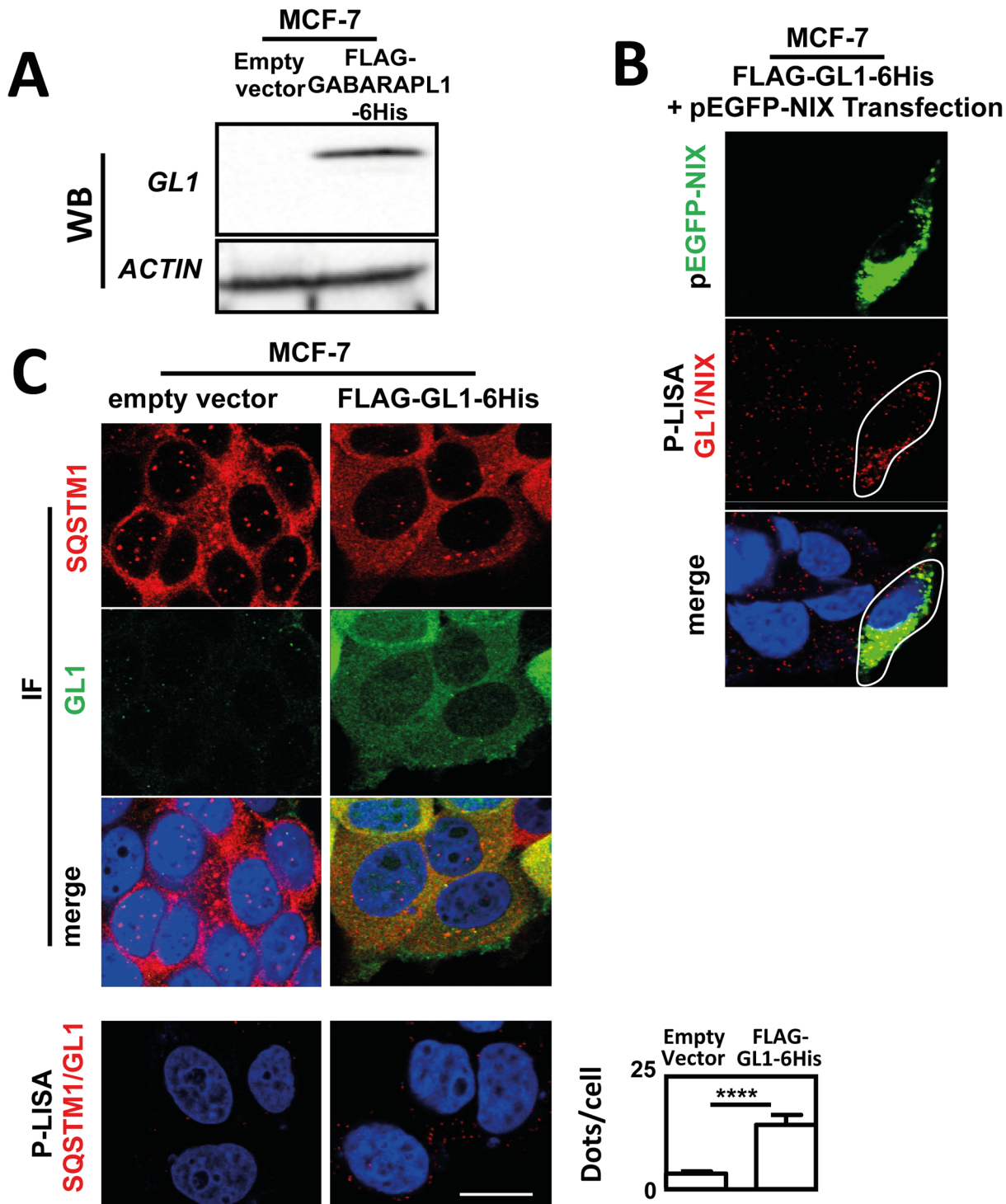


Fig 3. Increase of SQSTM1/GL1 and NIX/GL1 interactions quantified by P-LISA in MCF-7 overexpressing FLAG-GABARAPL1-6His and GFP-NIX. (A) Expression of GL1 protein was analyzed using western blotting in MCF-7 expressing or not FLAG-GL1-6His. (B) MCF-7 Control or MCF-7 FLAG-GL1-6His cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, fixed, permeabilized, blocked with 5% BSA, incubated with mouse anti-SQSTM1 and rabbit anti-GL1 antibodies overnight at 4 °C and then with an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse and an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, respectively, for 1 h. The cells were then analyzed using a confocal microscope (top panel). For P-LISA, the protocol was performed according to the manufacturer's recommendations using mouse anti-SQSTM1 and rabbit anti-GL1 antibodies (bottom panel). (C) MCF-7 FLAG-GL1-6His cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ and transfected with pEGFP-NIX plasmid and then fixed and permeabilized. P-LISA was performed as recognized by the manufacturer using rabbit anti-GL1 and mouse anti-NIX antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random. Scale bar: 20µm.

doi:10.1371/journal.pone.0128701.g003

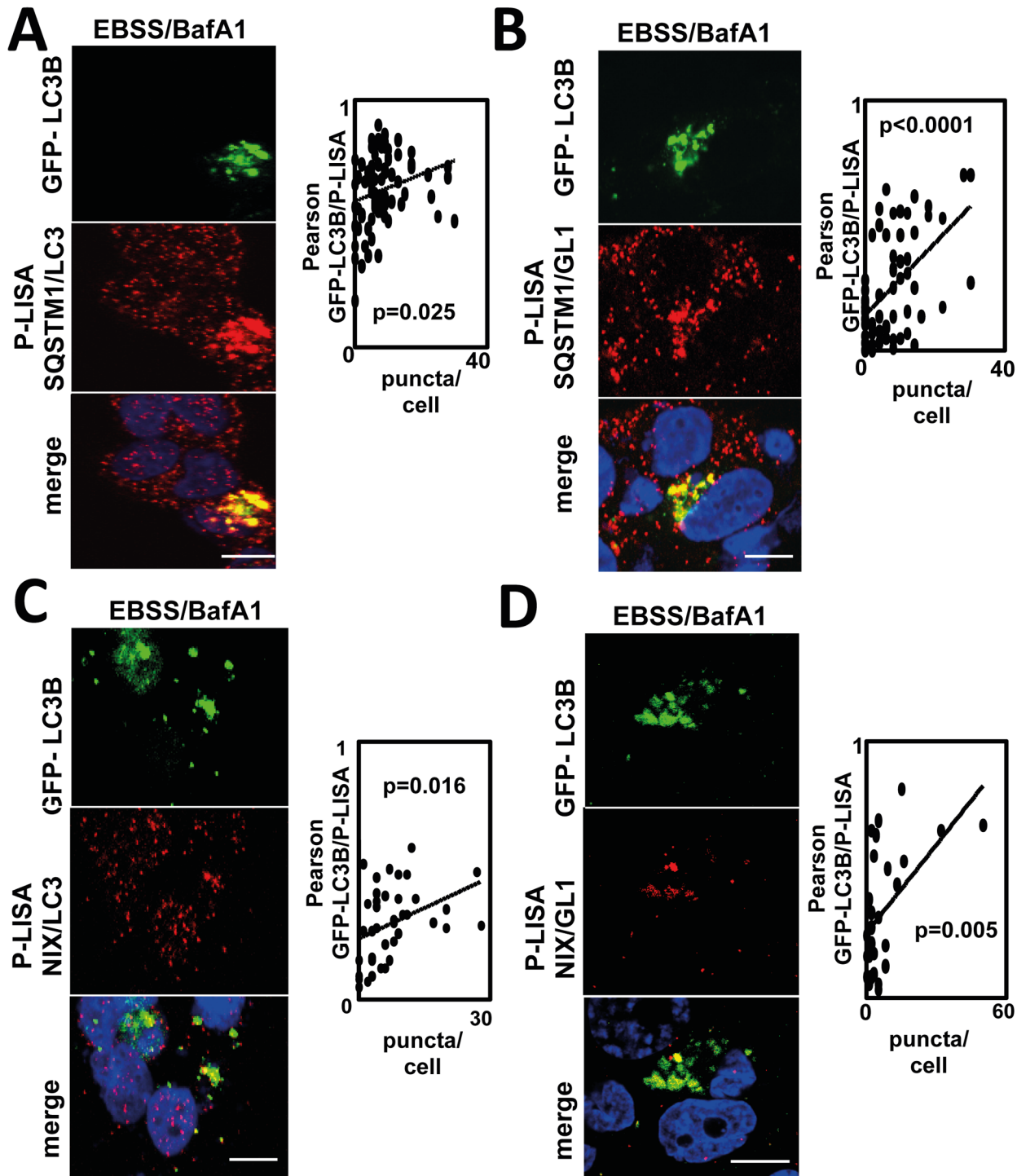


Fig 4. Co-localization of SQSTM1/LC3B, SQSTM1/GL1, NIX/LC3B and NIX/GL1 P-LISA signals with the GFP-LC3B protein. MDA-MB-436 cells were transfected with the pEGFP-LC3B vector then cultured with EBSS and BafA1 (100 nM) for 2 h. (A) Co-localization of SQSTM1/LC3B P-LISA signal and GFP-LC3B fluorescence. (B) Co-localization of SQSTM1/GL1 P-LISA signal and GFP-LC3B fluorescence. (C) Co-localization of NIX/LC3B P-LISA signal and GFP-LC3B fluorescence. (D) Co-localization of NIX/GL1 P-LISA signal and GFP-LC3B fluorescence. Co-localization of P-LISA signal and GFP-LC3B puncta was determined in at least 30 cells using the imageJ software. Nuclei were stained with DAPI. ****: $p \leq 0.0001$ and ***: $p \leq 0.001$, vs control ($n = 3$). Scale bar: 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0128701.g004

we quantified both the number of P-LISA signals as well as the intensity per dot in untreated and treated MDA-MB-436 cells (Fig 5). Since autophagic vesicles frequently accumulate in clusters, the result is a partial or total overlap of the P-LISA signals. This explains why close interactions could not be independently quantified. However, this concentration of signals in the same area of the cell led to the increase of intensity per dot and this parameter is therefore useful to quantify autophagy since a strong increase of intensity per dot, without an apparent increase of dots per cell, also corresponds to a significant increase in ATG/cargo adaptor interactions which are preferentially concentrated in specific punctates.

All treatments significantly increased SQSTM1/LC3B P-LISA signals (Fig 5A and 5E) suggesting an accumulation of autophagosomes in the cells. Moreover, SQSTM1/LC3B PLISA intensity per dot was also increased following exposure to the three autophagy inducers suggesting a relocalization of SQSTM1/LC3B interactions in these vesicles. Although the increase of intensity per dot is quite similar (about 1.5 to 2 fold) following treatment with the different autophagy inducers, the highest increase in intensity per dot and the lowest increase in dots per cell was obtained after Rapa treatment whereas the lowest increase in intensity per dot and the highest increase in dots per cell was induced by CCCP. These results suggest that these three autophagy inducers increased SQSTM1/LC3B interactions but that SQSTM1/LC3B interactions are more concentrated in specific areas of the cells following Rapa treatment.

CCCP and Rot treatments led to the highest increase in SQSTM1/LC3B P-LISA signals. As expected, transfection of *LC3B* siRNA extinguished SQSTM1/LC3B P-LISA signals in cells treated with CCCP demonstrating, once again, the specificity of these signals (S4 Fig). On the opposite, no variations in the number of SQSTM1/GL1 P-LISA signals were observed following the different treatments (Fig 5B and 5E). Interestingly, when we analyzed the interactions involving NIX, an autophagy adaptor described to be involved in mitophagy, we only observed an increase in P-LISA signals following treatments using specific mitochondrial stress inducers (Fig 5C, 5D and 5E).

Altogether, our P-LISA experiments led to the conclusion that NIX/GL1 and LC3B/NIX P-LISA can be used to specifically monitor mitophagy while SQSTM1/LC3B P-LISA, but not SQSTM1/GL1 P-LISA, is more suitable to study overall autophagy levels.

Discussion

Whereas autophagy quantification is a crucial point when studying autophagy or biological pathways regulating autophagy, end-points analysis remain often difficult to interpret due to the dynamic autophagy flux which corresponds to the sum of initiation and degradation. Several methods have been developed by the autophagy community to quantify autophagy but western-blotting of SQSTM1 and LC3B-II moieties still remains the most popular experiment to estimate autophagy.[12] However, some recent data showing the frequent transcriptional up-regulation of *SQSTM1* following different autophagy-inducing stresses have demonstrated that the levels of this protein cannot exclusively be linked to autophagy degradation anymore.[26]

Quantification of fluorescent vesicles following pGFP-LC3B or pmRFP-LC3B expression is also considered as a powerful tool useful for autophagy quantification but is limited to cells in culture. Moreover, fluorescence intensities of the GFP or mRFP reporter proteins are difficult to quantify due to variable levels of expression in transfected cells. In addition, some cells remain difficult to transfect and autophagy flux could not be analyzed using this protocol. Moreover, it has been shown that overexpression of GFP-LC3B can induce the formation of aggregates independent of its role in autophagy.[15,27] More recently, the development of a new vector called ptf-LC3B leading to the expression of a double-tagged GFP-RFP-LC3B

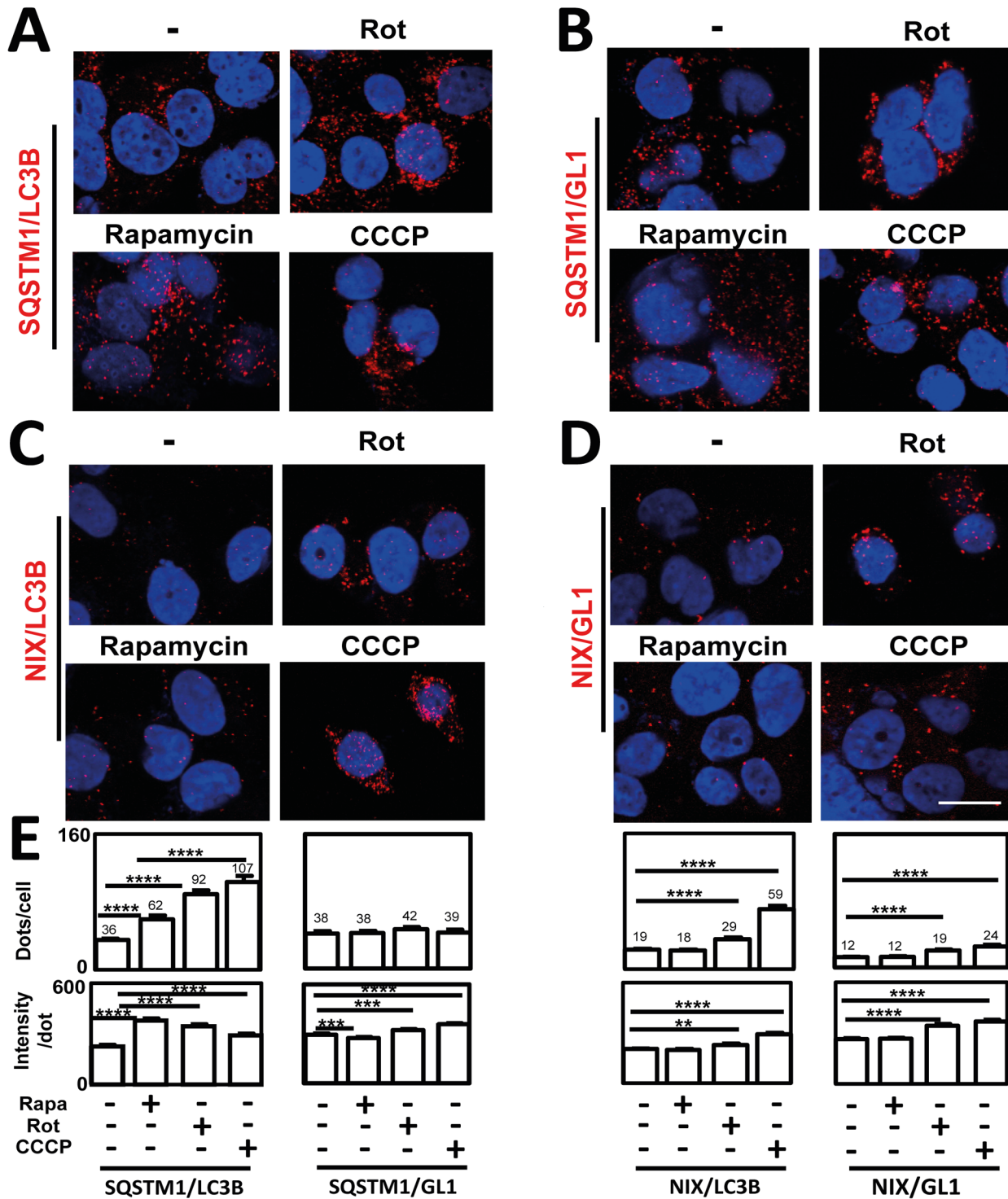


Fig 5. Effects of Rapamycin, Rotenone and CCCP on ATG8/cargo adapter interactions. MDA-MB436 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ then with Rapa (10 μM for 5h), Rot (50 μM for 24h) or CCCP (100 μM for 24h). (A) SQSTM1/LC3B, (B) SQSTM1/GL1, (C) NIX/LC3B and (D) NIX/GL1 P-LISA were performed according to the manufacturer's recommendations using mouse anti-NIX or anti-SQSTM1 and rabbit anti-GL1 or anti-LC3B antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random. (E) Quantification of P-LISA signals (dots/cell and intensity per dot) was performed using the Blobfinder software. Each bar (Mean ± SEM) represents the mean obtained from the quantification of signals observed in about 200 cells chosen randomly in 5 different fields from 3 independent experiments. ****: p ≤ 0.0001, ***: p ≤ 0.0001, and **: p ≤ 0.001, vs control. Scale bar: 20 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0128701.g005

protein has helped in the study of autophagy flux. Indeed, this recombinant protein allows to distinguish between autophagosomes and autophagolysosomes. Nevertheless, the quantification of red and yellow dots still remains difficult to perform in cells and this protocol is still linked to the necessity of high transfection rates. Moreover, co-localization of this double fluorescent protein with other ATG proteins remains almost impossible to interpret. These data strongly suggest that autophagy should be analyzed by a combination of protocols and techniques.

Recent new data have also demonstrated that autophagy can be non selective or selective and that these two processes might require different autophagy proteins in the cells. For example, some specific ATGs or autophagy-related proteins, such as NIX, have been described to be specifically involved in selective autophagy of mitochondria, called mitophagy. Therefore, in order to improve the quantification of autophagy and to better discriminate between non selective or selective autophagy, we developed a P-LISA protocol to specifically monitor ATG8/cargo adapter interactions. First we asked whether this technique could be used to quantify cellular autophagy levels and, then, to discriminate between different types of induced autophagy. Indeed, the currently available techniques are preferentially used to quantify autophagic flux (WB, IF) and are not always sensitive enough to quantify slight modifications of autophagy levels. Our data confirmed that the SQSTM1/LC3B and SQSTM1/GL1 P-LISA signals detected in the cells were indeed specifically related to autophagy as demonstrated by their strong co-localization with GFP-LC3B vesicles in autophagy-induced cells following an EBSS/BafA1 treatment. Then, our data led to the conclusion that SQSTM1/LC3B interactions measured by P-LISA were increased in all treatments described to induce autophagy and might be used to quantify overall autophagy rates. On the opposite, NIX/GL1 and NIX/LC3B P-LISA appeared to be useful to discriminate between rapa-induced autophagy and specific degradation of mitochondria and therefore might be used to quantify selective mitophagy.

In conclusion, our work proves that P-LISA can be used as a new tool for autophagy quantification and for the discrimination between different induced selective autophagy. Moreover, since this technique can be adapted to the study of protein interactions in paraffine-included tissue samples or *in vivo* biological tissues, this technique could become an useful tool to perform diagnostic test targeting endogenous autophagy proteins.[28]

Supporting Information

S1 Fig. Schematic representation of the P-LISA protocol. (A) Two primary antibodies issued from distinct species recognize specific endogenous ATG proteins supposed to interact. (B) Secondary antibodies called Proximity Ligation Assay (PLA) probes, each coupled to an oligonucleotide + or an oligonucleotide -, recognize the two primary antibodies. (C) A circular probe targets the PLA + and -, only if the distance between these probes is less than 40nm. (D) Circular DNA is amplified by a DNA polymerase. (E) DNA probes coupled to fluorochromes hybridize to amplicons and lead to the formation of intracellular fluorescent dots specific to the interaction of the two ATG proteins.

(TIF)

S2 Fig. Effect of EBSS/BafA1 treatment and influence of GFP-LC3B expression on SQSTM1/LC3B P-LISA signals. MDA-MB-436 cells were transfected with the pEGFP-LC3B vector then treated or not with EBSS and BafA1 (100 nM) for 2 h (left panel). SQSTM1/LC3B P-LISA signals were quantified in about 20 cells (right panel). Nuclei were stained with DAPI.

***: $p \leq 0.0001$ and **: $p \leq 0.01$.

(TIF)

S3 Fig. Effects of Rapamycin, BafA1, CQ, Rotenone and CCCP on LC3B-II levels.

MDA-MB436 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ then treated with Rapa (10 μM for 5h, BafA1 (100 nM for 2h), Chloroquin (40 μM for 2h)), Rot (50 μM for 24h), or CCCP (100 μM for 24h). Accumulation of the LC3B-II form was determined by western blotting using an anti-LC3B antibody.

(TIF)

S4 Fig. SQSTM1/LC3B P-LISA in cells transfected with *siLC3B* and treated with CCCP.

MDA-MB-436 cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ and treated with CCCP (100 μM for 24h). P-LISA was performed according to the manufacturer's recommendations. Inhibition of SQSTM1/LC3B P-LISA signals was observed in cells previously transfected with *siLC3B* compared to cells transfected with a *siRNA* control. Nuclei were stained with DAPI. Each picture is a representative image of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random.

(TIF)

Acknowledgments

This work was supported by the University of Franche-Comté, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and fundings from Région de Franche-Comté 2013 and CCIR-GE Ligue Contre le Cancer 2014 (#007.Y-2014). AT was supported by a fellowship of Région de Franche-Comté.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EH MBG. Performed the experiments: TG ACT EH. Analyzed the data: TG ACT EH MBG RDM. Wrote the paper: EH MBG.

References

1. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, et al. (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 29: 1792–1802. doi: [10.1038/emboj.2010.74](https://doi.org/10.1038/emboj.2010.74) PMID: [20418806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20418806/)
2. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, et al. (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 11: 45–51. doi: [10.1038/embor.2009.256](https://doi.org/10.1038/embor.2009.256) PMID: [20010802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20010802/)
3. Deosaran E, Larsen KB, Hua R, Sargent G, Wang Y, et al. (2013) NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci* 126: 939–952. doi: [10.1242/jcs.114819](https://doi.org/10.1242/jcs.114819) PMID: [23239026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23239026/)
4. Gibbings D, Mostowy S, Jay F, Schwab Y, Cossart P, et al. (2012) Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol* 14: 1314–1321. PMID: [23143396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23143396/)
5. Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I (2009) NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 5: 732–733. PMID: [19398892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19398892/)
6. Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F (2010) Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett* 584: 1379–1385. doi: [10.1016/j.febslet.2010.01.018](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.018) PMID: [20083108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20083108/)
7. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466: 68–76. doi: [10.1038/nature09204](https://doi.org/10.1038/nature09204) PMID: [20562859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20562859/)
8. Takahashi Y, Young MM, Serfass JM, Hori T, Wang HG (2013) Sh3glb1/Bif-1 and mitophagy: acquisition of apoptosis resistance during Myc-driven lymphomagenesis. *Autophagy* 9: 1107–1109. doi: [10.4161/auto.24817](https://doi.org/10.4161/auto.24817) PMID: [23680845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23680845/)
9. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, et al. (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8: 688–699. PMID: [16799551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16799551/)
10. 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. PMID: [10604474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10604474/)
11. Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19: 983–997. doi: [10.1038/nm.3232](https://doi.org/10.1038/nm.3232) PMID: [23921753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921753/)

12. 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. PMID: [22966490](#)
13. Nyfeler B, Bergman P, Wilson CJ, Murphy LO (2012) Quantitative visualization of autophagy induction by mTOR inhibitors. *Methods Mol Biol* 821: 239–250. doi: [10.1007/978-1-61779-430-8_14](#) PMID: [22125069](#)
14. Larsen KB, Lamark T, Overvatn A, Harneshaug I, Johansen T, et al. (2010) A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1. *Autophagy* 6: 784–793. PMID: [20574168](#)
15. Ciechomska IA, Tolkovsky AM (2007) Non-autophagic GFP-LC3 puncta induced by saponin and other detergents. *Autophagy* 3: 586–590. PMID: [17786021](#)
16. Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bole-Richard E, Ouyang X, et al. (2014) The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy* 10: 986–1003. doi: [10.4161/aut.28390](#) PMID: [24879149](#)
17. Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, et al. (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. doi: [10.1074/jbc.M110.119537](#) PMID: [20573959](#)
18. Allalou A, Wahlby C (2009) BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry. *Comput Methods Programs Biomed* 94: 58–65. doi: [10.1016/j.cmpb.2008.08.006](#) PMID: [18950895](#)
19. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, et al. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131–24145. PMID: [17580304](#)
20. Shvets E, Abada A, Weidberg H, Elazar Z (2011) Dissecting the involvement of LC3B and GATE-16 in p62 recruitment into autophagosomes. *Autophagy* 7: 683–688. PMID: [21460636](#)
21. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, et al. (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem* 285: 5941–5953. doi: [10.1074/jbc.M109.039925](#) PMID: [20018885](#)
22. Buckingham EM, Carpenter JE, Jackson W, Grose C (2014) Nuclear LC3-positive puncta in stressed cells do not represent autophagosomes. *Biotechniques* 57: 241–244. doi: [10.2144/000114226](#) PMID: [25399676](#)
23. Joselin AP, Hewitt SJ, Callaghan SM, Kim RH, Chung YH, et al. (2012) ROS-dependent regulation of Parkin and DJ-1 localization during oxidative stress in neurons. *Hum Mol Genet* 21: 4888–4903. doi: [10.1093/hmg/dds325](#) PMID: [22872702](#)
24. Chu CT, Bayir H, Kagan VE (2014) LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease. *Autophagy* 10: 376–378. doi: [10.4161/aut.27191](#) PMID: [24351649](#)
25. Park S, Choi SG, Yoo SM, Son JH, Jung YK (2014) Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy. *Autophagy* 10: 1906–1920. doi: [10.4161/aut.32177](#) PMID: [25483962](#)
26. (2014) p62 Loss Reprograms Stromal Metabolism to Promote Tumor Growth. *Cancer Discov* 4: OF17. doi: [10.1158/2159-8290.CD-RW2014-196](#) PMID: [25367958](#)
27. Korkhov VM (2009) GFP-LC3 labels organised smooth endoplasmic reticulum membranes independently of autophagy. *J Cell Biochem* 107: 86–95. doi: [10.1002/jcb.22103](#) PMID: [19259979](#)
28. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, et al. (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3: 995–1000. PMID: [17072308](#)

4. Revue

"Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for breast cancer therapies."

Claude-Taupin A, Boyer-Guittaut M, Delage-Mourroux R, Hervouet E.

Methods Mol Biol. (2015)

Use of Epigenetic Modulators as a Powerful Adjuvant for Breast Cancer Therapies 2 3

[AU1] **Aurore Claude-Taupin, Michael Boyer-Guittaut, Régis Delage-Mourroux, and Eric Hervouet 4
5**

Abstract 6

Breast cancer (BC) is one of the five most frequent cancers in the world. Despite earlier diagnosis and development of specific treatments, mortality has only declined of about 30 % during the past two decades. Two of the main reasons are the emergence of drug resistance and the absence of specific therapy for triple negative breast cancers (TNBC), which are characterized by a poor prognosis due to high proliferation rate. Therefore, the future goal of the fight against BC will be to find new therapeutic approaches to overcome drug resistances and cure TNBC. Recent research on gene expression profiles linked to the different types of BC cells have led to consider the use of epigenetic modulators to modulate the expression of genes deregulated in cancer. The preliminary encouraging results have demonstrated a positive effect of DNA Methyl Transferase (DNMT) and Histone DeAcetylase (HDAC) inhibitors on different types of BC, as well as drug-resistant cells, with low side effects. In this review, we will describe the different epigenetic modulators currently used or investigated in BC therapy research in vitro as well as preclinical and clinical trials, and promising compounds, which might be used in future BC therapies. 7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Key words Breast cancer, DNA, DNMT, DNMTi, Epigenetic, HDAC, HDACi, Histone, Methylation, Therapy 19
20

Abbreviations 21

ATF	Artificial transcription factor	22
BC	Breast cancer	23
DCIS	Ductal carcinoma in situ	24
DNMT	DNA methyl transferase	25
ER	Estrogen receptor	26
HDAC	Histone deacetylase	27
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2	28
PR	Progesterone receptor	29
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid	30
TNBC	Triple negative breast cancer	31

32	TSA	Trichostatin A
33	TSG	Tumor suppressor gene
34	VPA	Valproic acid

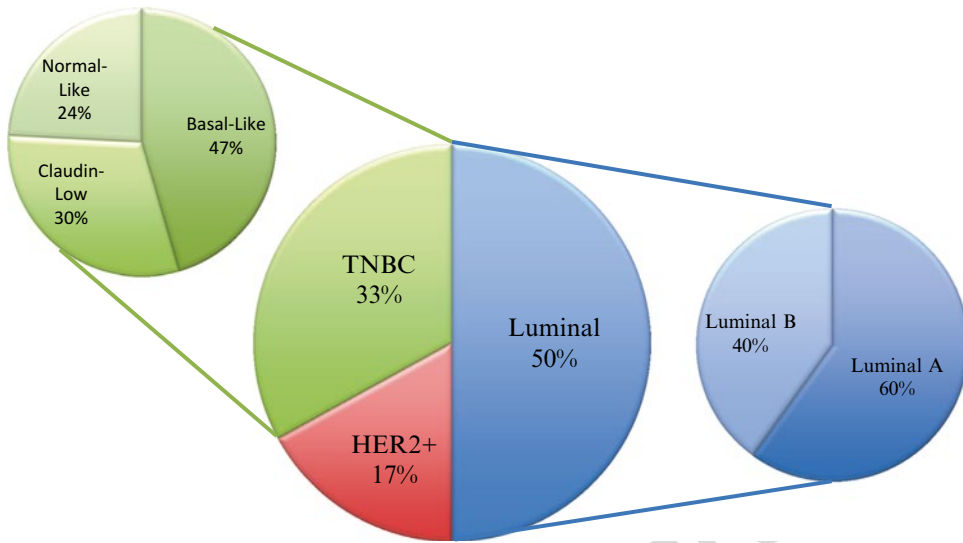
35 1 Introduction

36 According to the World Health organization, breast cancer (BC) is
37 one of the five most frequent cancer observed in the World, with
38 1.4 million new cases and 458,000 deaths in 2008 [1]. Thanks to
39 earlier detection and more adequate treatments, mortality linked
40 to this pathology has declined about 30 % over the past two
41 decades. Nevertheless, the American Cancer Society estimated
42 64,640 new cases of breast carcinoma in situ (the first stage of can-
43 cer, without invasion of BC cells) in the USA in 2013 [2]. Apart
44 from pediatric cancers, most cancers are linked to aging popula-
45 tions. Indeed, more than one cellular event is required to induce
46 BC, and the probability to observe these events increase with age:
47 nearly half of BC are diagnosed for women between 50 and 69
48 years of age in the UK. Various risk factors have been correlated to
49 BC such as age, gender, race, ethnicity, or lifestyle but it is now
50 well described that the most important risk factor for BC is genetic
51 and more precisely, heredity. For example, more than 1,000 muta-
52 tions of Breast Cancer 1 (*BRCA1*) and *BRCA2* genes have been
53 repertoried in high-risk families (reviewed in [3]).

54 Therefore, it is now widely accepted that cancer development is
55 a multistep process, which originates from atypical ductal hyperpla-
56 sia to become ductal carcinoma in situ (DCIS). DCIS is a noninva-
57 sive pathology, but if not treated, could grow, spread, and become
58 an invasive and more aggressive BC [4]. Many genetic and epi-
59 genetic alterations are linked to the evolution of BC, such as both
60 mutations and hypermethylation of the tumor suppressor gene
61 Breast Cancer 1 (*BRCA1*) [5], hypermethylation of *RASSF1A* [6]
62 or hypomethylation of the oncogene *SYNUCLEIN γ* [7].

63 BC is not just one disease. Indeed, the various molecular alter-
64 ations, which have been associated with the initiation of the inva-
65 sive process, are heterogeneous, and reflect numerous subtypes
66 (Fig. 1). The current BC classification is based on two different
67 approaches: the immunohistochemical detection of cellular mark-
68 ers (estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and
69 human epidermal growth receptor 2 (HER2)) or the molecular
70 characterization of gene expression profiles. Using the latter clas-
71 sification, the most currently used in clinical studies, five different
72 BC subgroups have been characterized and it has been described
73 that these subtypes respond differently to treatments and are
74 associated with different clinical outcomes [4] (we will use this clas-
75 sification, based on gene expression profiles, throughout this
76 review). Today, many different primary therapeutic protocols are

Breast cancers molecular subtypes



this figure will be printed in b/w

Fig. 1 Histogram describing the percentage of the breast cancers molecular subtypes in the overall population. The classification used for this study is based on the analysis of gene expression profiles. Adapted from ref. [3]. *TNBC* Triple negative breast cancers, *HER2* Human epidermal growth factor receptor 2.

used to treat the different BC subtypes (as described later), but in spite of an increasing interest for epigenetics in BC tumorigenesis, none of them involves epigenetic drugs.

[AU3] **1.1 Luminal Subgroups**

Luminal A and B, which represent 50 % of total BC are generally associated with a good prognosis. These two types of BC are characterized by the expression of the estrogen receptor ER (ER⁺) that is involved in cell proliferation, survival, and invasion of BC cells. Nevertheless, endocrine therapy targeting the ER pathway has proven to be really efficient way to treat this type of cancer and several molecules targeting this pathway are currently used: Tamoxifen, which antagonizes ER, Fulvestrant that decreases the level of ER, or Letrozole, an aromatase inhibitor (AI) that decreases estrogens levels via the inhibition of androgen metabolism [8].

BC patients with luminal B tumors frequently present a worse prognosis than luminal A patients. This might be explained by the presence of an amplification of the *HER2* gene, associated with a strong proliferation phenotype. As luminal B patients are both positive for ER and HER2, therapies combine the protocol used for luminal A BC supplemented with an HER2 inhibitor (e.g., Letrozole combined with Lapatinib, a synthetic HER2/1 inhibitor, a combination which has already been approved by FDA).

1.2 HER2⁺ Subgroup

HER2⁺ patients are characterized by the amplification of the onco-gene *HER2*. Due to the absence of ER expression, these tumors

t1.1 **Table 1**
 t1.2 **Chemotherapies used in treatment of BC cited in this review and their mechanism of action**

[AU4]

t1.3	Drug	Target	Mechanism of action
t1.4	5-fluorouracil	DNA	Inhibition of DNA and RNA synthesis
t1.5	Cisplatin		Inhibition of DNA synthesis, DNA damage, mutations
t1.6	Doxorubicin		Intercalation between base pairs, inhibition topoisomerase II
t1.7	(=Adriamycin)		Inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis
t1.8	Epirubicin		
t1.9	Paclitaxel	Microtubules	Binds to tubulin β , therefore inducing the stabilization of microtubules (dynamic is stopped)
t1.10			

100 differ from luminal B cancers and hormonotherapies have been
 101 proven to be inefficient. HER2 overexpression was first associated
 102 with poor clinical outcomes but, during the last 15 years, the
 103 development of a growing number of new drugs targeting HER2
 104 (e.g., Trastuzumab, Lapatinib, or Pertuzumab) and their applica-
 105 tion in combination with already existing cytotoxic chemothera-
 106 pies (described in Table 1) have improved the long-term survival of
 107 these patients.

108 **1.3 Triple Negative**
 109 **Subgroup (TNBC)**

110 Triple negative BC (ER⁻/PR⁻/HER2⁻), which is associated with a
 111 poor prognosis, is characterized by the absence of expression of
 112 both estrogen and progesterone receptors, but HER2 protein as
 113 well. These tumors are divided in three subgroups: (a) *Basal-Like*:
 114 these tumors exhibit some characteristics of breast myoepithelial
 115 cells, associated with both a high rate of proliferation and an
 116 extremely poor prognosis. (b) *Claudin-Low BC*: these tumors,
 117 which are associated with a poor prognosis, present an epithelial-to-
 118 mesenchymal transition (EMT) and stem-cell-like and/or tumor
 119 initiating cell features [9]. (c) *Normal-Like*: since these tumors
 120 present all features of non-pathological epithelial breast tissue,
 121 their classification is particularly difficult to establish and still under
 122 discussion mainly because of the absence of specific markers.

122 TNBC can however be responsive to preoperative
 123 Anthracycline/Taxane-based chemotherapies (e.g., docetaxel,
 124 doxorubicin, and cyclophosphamide) but a poor prognosis is given
 to patients who failed to be sensitive.

125 **1.4 New Therapeutic**
 126 **Strategies: A Real**
 127 **Necessity**

128 As described above, in spite of the existence of specific therapies for
 129 several BC subgroups, numerous studies have reported the apparition
 130 of acquired and de novo resistances during the course of
 131 treatments. Moreover, a specific therapy for TNBC is still lacking.
 Nevertheless, the extensive research that has been conducted on
 BC subtypes tumorigenesis during the last 20 years led to the
 emergence of new potential therapeutical strategies to fight BC.

Numerous approaches have been focused on finding inhibitors of the apparition of endocrine resistances.

For example, inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, which presents an essential role in growth and survival signal transduction, have been developed. Since cyclin expression is also increased in ER⁺ resistant BC, CDK4/6 inhibitors have been developed to inhibit cell cycle [10]. Antiangiogenic agents (e.g., Bevacizumab, anti-vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)) have also been developed since TNBC have been described to present higher levels of VEGF-A than other breast cancer subtypes [11]. We can also cite PARPs (poly(ADP-ribose) polymerases) inhibitors which have been developed in order to induce cell death in deficient homologous repair cells, such as BRCA1/BRCA2 mutated BC. These compounds gave promising results in TNBC BRCA1 mutated patients but the benefits of using PARPs inhibitors have not been proven in unselected TNBC clinical studies. Despite the potential effects on tumorigenesis of these new molecules, a specific TNBC therapy has yet to be approved.

Moreover, while genetic changes in BC are often correlated to subgroups, response to treatment and clinical outcomes, some epigenetic events were also reported to be related to the apparition of hormone therapy resistances [12] and numerous studies have developed new epigenetic approaches to restore ER expression in resistant BC cells [13]. Indeed, as soon as 1999, Soares et al. [12] reported a global DNA hypomethylation in breast carcinomas compared to normal cells suggesting a role of epigenetics in BC carcinogenesis. So, even if genetic or epigenetic alterations are some of the most promising targets to treat BC, none of the many existing primary therapeutic protocols currently used to treat BC actually target epigenetic mechanisms.

In this review, we therefore describe the different epigenetic modulators used in BC therapies research and clinical trials, and the novel epigenetic strategies that might be used in the future in clinic. This review focuses on DNA methylation and posttranslational histone modifications, which are the major epigenetic modifications that control gene expression.

2 DNMT Inhibitors in BC Therapy

DNA methylation consists of the transfer of methyl residues on CpG dinucleotide-rich regions, called CpG Islands, located in the 5' untranslated region of genes. This promoter methylation is accepted to be associated with gene repression. These methylation events are catalyzed by three DNA methyl transferases (DNMT): DNMT1 mainly catalyzes the DNA methylation of maintenance, while DNMT3a and DNMT3b are de novo methyltransferases.

177 Since promoter methylation is described to inhibit gene tran-
 178 scription, DNMT inhibitors (DNMTi) could be used to reverse
 179 the repression of tumor suppressor genes (TSG) or Estrogen
 180 Receptor 1 (*ESR1*) gene (which encodes ER α) in BC cells.
 181 Nucleoside analogues, a class of DNMTi, have already been used
 182 for a long time in in vitro studies. The main compounds used in
 183 these studies are 5-azacytidine and 5-*aza*-2'-deoxycytidine (*5-azadC*),
 184 which are incorporated into DNA in replacement of cytosines dur-
 185 ing the replication process. Then, when DNMTs are recruited on
 186 the DNA to methylate cytosines, the enzymes are trapped by the
 187 analogue and cannot exert their function anymore, therefore
 188 inducing a passive DNA demethylation following DNA replication
 189 and cell division [14].

190 **2.1 Preclinical Data**
 191 **Obtained Using DNMT**
 192 **Inhibitors**
 193

The classical BC cell lines (described in Table 2), used for preclinical studies are representative of the different molecular subtypes of BC. These models are the closest in vitro models available to predict BC cells response to the new treatments tested.

194 **2.1.1 Decitabine**

Numerous studies have described beneficial effects of the DNMTi Decitabine (1–10 μ M) on both viability and TSG expression in different BC cell lines, including Triple Negative Breast cancer (TNBC) models in vitro.

195
 196
 197
 198 These preclinical studies revealed a large panel of changes in
 199 phenotype linked to Decitabine: (a) inhibition of cell growth
 200 [15–17]; (b) re-expression of TSG such as *HER4* in BT20 cells (an
 201 inhibitor of proliferation which promotes differentiation and/or
 202 apoptosis [18]), Dishevelled-Binding Antagonist Of Beta-Catenin
 203 1 (*DACT1*), an antagonist to the Wnt/ β -catenin signaling, in
 204 MCF-7 and MDA-MB-231 cells [19], Protein Kinase D1 (*PRKDI*),
 205 which maintains epithelial phenotype, in MDA-MB-231 cells [20],
 206 Ras-association domain family 1 gene (*RASSF1A*), which blocks

t2.1 **Table 2**
 t2.2 **Breast cancer cell lines linked to the different subtypes of breast cancers**

t2.3	Classification	Immunoprofile	Breast cancer cell line
t2.4	Luminal A	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻	MCF7, T47D
t2.5	Luminal B	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁺	BT-474, ZR-75
t2.6	HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	MDA-MB-453
t2.7	Claudin-low	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	BT549, Hs578T, MDA-MB-231
t2.8	Basal-like	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	BT-20, MDA-MB-468

t2.9 *ER* Estrogen receptor, *PR* Progesterone receptor, *HER2* Human epidermal growth
 t2.10 factor receptor 2
 t2.11 Adapted from refs. [95, 96]

cell-cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation, in MCF-7 [21], Mismatch Repair Genes in MCF-7 cells [22], or *CLAUDIN-1* (implicated in tight junctions, whose downregulation is associated with metastasis in BC) in MDA-MB-453 cells [23]; (c) induction of apoptosis in BT-20 cells [18]; and/or (d) induction of the expression of ER in MDA-MB-231 cells [24, 25].

The reactivation of expression of TSG in BC cells is required to reestablish a non-cancerous phenotype and a response to treatments. Therefore, it is an important finding that Decitabine can reinduce the expression of TSG in different subtypes of BC, in particular in TNBC, for which specific therapies are not yet available, or in luminal subtypes of BC to avoid the apparition of resistances to hormonotherapies.

However, the effect of Decitabine might be different in ER⁺ and ER⁻ BC cell lines. Indeed, a 48 h treatment with 10 μ M Decitabine induces the invasiveness of MCF-7 cells (ER⁺), but decrease the invasive capacities of MDA-MB-231 cells (ER⁻) [26]. Indeed, treatment of MCF-7 with Decitabine reduces ER protein levels [24], demonstrating the importance of the selection of patients according to their genetic profiles. Indeed, it has been reported that a decrease of ER mRNA stability, through the modulation of the RNA Binding protein HuR, is observed after a Decitabine treatment of ER⁺ cell lines [27]. If an ER⁺ BC is pretreated with Decitabine, it would not be sensitive to future hormonotherapy anymore due to the loss of ER expression, therefore increasing the risk of the apparition of resistance to treatments. This might explain why conflicting results have been obtained while using Decitabine alone.

Furthermore, Jawaid et al. have shown no growth inhibition of Decitabine on MCF-7 and MDA-MB-231 cells after a 10 μ M treatment during 72 h, but only a weak effect on MCF-7 growth with lower concentrations (100 and 500 nM) [28].

Due to the high Decitabine concentration (doses > 500 nM) required to observe a significant response in BC cells, the use of this compound in BC patients is not recommended since negative side effects will more likely be induced [29]. In order to limit cytotoxicity, low doses of Decitabine were tested in combination with other chemotherapeutic molecules. For example, Sandhu et al. [29] used up to 0.5 μ M of Decitabine in MDA-MB-453, BT-549, and Hs578T cells before treatment with Doxorubicin, Paclitaxel or 5-fluorouracil, combinations which effectively enhance chemotherapies efficiency following DNMT inhibition for 7 days. Similar results have also been obtained with MCF-7 and MDA-MB-231 cells but for higher doses of Decitabine (10 μ M for MCF-7 and 12 μ M for MDA-MB-231 for 72 h), demonstrating that synergistic effects are observed when MDA-MB-231 cells are pretreated with Decitabine before the use of Paclitaxel, Adriamycin, or 5-fluorouracil. In MCF-7, semi-additive effects were only observed

with the 5- fluorouracil chemotherapy [30]. It is noteworthy that low doses of Decitabine during 24 or 72 h (0.2 μM) efficiently restore chemotherapy-resistant MCF-7 cells sensitivity to Doxorubicin [31, 32]. However, these results were moderated by Ari et al. in 2011 [26]. In their study, they showed that Decitabine stimulated invasiveness features of MCF-7 cells (10 μM for 48 h), reversed by a standard polychemotherapy (5- fluorouracil, Epirubicine, and Cyclophosphamide), while decreasing the invasive capacity of MDA-MB-231 cells. Induction of invasiveness by Decitabine was supported by another team which indicated that a concentration of 2.5 μM of Decitabine induced human *CRYPTO-1* (*CR-1*) mRNA expression, a gene involved in invasion and tumor progression [33]. Moreover, Ateeq et al. [21] showed that treatment of 7 days of MCF-7 cells with 5 μM Decitabine in in vivo preclinical models decreased the growth of tumors but also induced the expression of prometastatic genes, such as *Heparanase*.

These results clearly demonstrate the critical role of Decitabine in cancer cells. Decitabine can induce the death of numerous types of BC cells and therefore inhibits cancer cell proliferation, but can also increase invasiveness features of cells. We therefore must be cautious when using this type of drugs because only one invasive cell is sufficient to induce metastasis. However, until now, the ability of Decitabine to induce tumor metastases has not yet been proven.

2.1.2 5-Azacytidine

The phenotypes of BC observed after treatment with 5-azacytidine alone are similar to those obtained with Decitabine. As described above for Decitabine: a decrease of BC cell growth, an increase of expression of tumor suppressor genes or the *ESR1* gene and an increase of apoptosis in tamoxifen-resistant MCF-7 cells (1 μM 5-azacytidine and Estradiol) have been shown after 5-azacytidine treatment during 6 days [34]. 5-azacytidine can also restore or amplify effects of chemotherapies. Indeed, different in vivo studies have shown a limitation of tumor growth in mice (5 mg/kg a day, three times a week during 5 weeks) [35], or potentiate Cisplatin effects while decreasing its nephrotoxicity in rats (2.5 mg/kg at days zero and three) [36].

Taken together these preclinical results, obtained using nucleoside analogues, have attracted an increasing interest to use these molecules in BC treatment and to be able to restore the cytotoxic effects of chemotherapies already used in clinical trials.

2.2 Clinical Trials Using DNMT Inhibitors-Based Protocols

A phase I study was performed in 2003 in order to test the side effects and determine the optimal dose of Decitabine to use to treat BC patients diagnosed with advanced solid tumors [37]. The results obtained showed that a 72 h intravenous infusion of Decitabine (30 mg/m² per day) was tolerated by the patients. Moreover, after samples analysis, changes in gene methylation were detected [38]. Indeed, the results showed a decrease of the

methylation of the calcitonin gene-related peptide (*CALCA*), a gene implicated in cell metabolism and often hypermethylated in BC. Decitabine has also been shown to be safely combined with chemotherapy, such as Carboplatin, in patients with solid tumors, as shown in 2007 during a phase I study [39]. A dose of Decitabine (90 mg/m²) followed by a dose of Carboplatin 8 days after (treatments renewed every 28 days) has been shown to be well tolerated. Since preclinical studies revealed the increased efficiency of treatments combining DNMTi with other drugs, a phase I/II study is currently recruiting patients with advanced solid tumors to evaluate the effects of 5-azacytidine combined with Abraxane, a Paclitaxel albumin-stabilized nanoparticle [40].

To our knowledge, there are few clinical trials using DNMTi in BC treatments. However, DNMTi are largely used in clinical trials in other types of cancers, such as acute myeloid leukemia or lung cancer. Furthermore, the first results obtained in clinical trials are encouraging, showing few side effects and its efficiency to modulate gene expression in patients.

3 HDACs Inhibitors

The degree of chromatin compaction is controlled by histones compaction, which is regulated by posttranslational modifications such as methylations, ubiquitylations, or acetylations. Histone acetylations are catalyzed by Histone Acetyl Transferases (HATs) and these modifications are associated with opened active chromatin allowing gene transcription while Histone Deacetylases (HDACs) remove these acetylations, close the chromatin and inhibit transcription. In BC, activity of Histone deacetylases (HDACs) has been correlated with inhibition of the expression of critical genes, such as TSG, and therefore HDACi have been tested in BC in order to determine whether they could improve the response to treatments or decrease tumor aggressiveness [41, 42].

Until now, five classes of HDACs inhibitors have been described (Table 3) and an increasing number of new molecules have been developed [14]. Since HDACs are specifically targeted to genes, the use of HDACi will only affect genes modified by the HDACs class targeted. Trichostatin A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) are actually the most extensively studied because they were first discovered, present a broad range of activity and inhibit HDACs class I and II.

3.1 Preclinical Data Obtained Using HDAC Inhibitors

3.1.1 TSA

Several studies have described growth inhibition and cell death in TNBC model cell lines (such as MDA-MB-231) treated with TSA alone (500 nM, 48 h [28] or 100 μM, 72 h [43]). These results point out that TSA can decrease the growth of ER⁻ BC cells, as it has been described for ER⁺ BC cells (like MCF-7 cells).

t3.1 **Table 3**
 t3.2 **HDAC inhibitor families and their targets**

t3.3	HDACi families	Names	HDACi target
t3.4	Hydroxamate based	TSA	HDAC class I and II inhibition
t3.5		SAHA	
t3.6		LBH 589	HDAC class I, II, and IV inhibition
t3.7			
t3.8	Aliphatic based	VPA	HDAC class I and II inhibition
t3.9			
t3.10	Cyclic peptide based	FK228	HDAC class I
t3.11	Benzamide based	MGCD0103	HDAC class I, II, and III inhibition
t3.12			
t3.13		SNDX-275	HDAC class I inhibition
t3.14			

t3.15 Based on refs.[14] and [97]

345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372

However, these doses are elevated and could be toxic for patients. Lower doses of TSA (0.1 μM) can also efficiently induce the expression of TSG within 14 h of treatment and increase the stability of ER in T47D cells after only 3 h of treatment [19, 44]. However, surprisingly, an other study using longer time of exposure (16 h, 0.3 μM TSA) have shown a decrease of ER protein expression in MCF-7 cells [45]. Moreover, it has been shown that TSA treatments sensitize TNBC cells to Tamoxifen [46], induce apoptosis [47], or decrease MCF-7 cell proliferation when used in combination with Raloxifen [48]. As seen above for DNMTi, drastic effects on BC features were only observed with high doses of TSA, but patients could better tolerate combinations of low doses of TSA and additional antitumoral drugs.

In most cases, epigenetic-mediated gene silencing is mediated by both DNA methylation and postranslational modifications of histones associated with chromatin condensation. Co-treatments with TSA and DNMTi could then improve the re-expression of these epigenetic regulated genes. Indeed, studies using TSA combined with Decitabine have restored Tamoxifen sensitivity in MCF-7 cells [49]. However, authors did not present any data showing that TSA/Decitabine pretreatment was more beneficial than each drug used alone. It is noteworthy that the sequence of administration of these drugs seems to be crucial since better results were obtained when Decitabine treatment preceded TSA/Tamoxifen co-treatment in MDA-MB-231 cells [50]. Indeed, DNMT and HDAC inhibitors synergize to induce re-expression of ER in ER⁻ BC cells, critical to induce sensitivity to Tamoxifen. When Decitabine was used before TSA/Tamoxifen treatment, the

ER mRNA levels observed were higher than the ER quantified with Decitabine used in the same time with TSA and Tamoxifen. Moreover, the restoration of sensitivity to Tamoxifen in ER⁻ cells treated with both Decitabine and TSA was confirmed in *in vivo* studies, suggesting the powerful use of epigenetic compounds to facilitate endocrine therapy [51]. Indeed, it has been demonstrated that the growth of xenografts performed with MDA-MB-435 pretreated with Decitabine (96 h, 2.5 μ M) and TSA (12 h, 100 ng/mL) decreased compared to the control, and *in vitro* experiments have shown that these epigenetic modulators can enhance the Tamoxifen-driven growth inhibition of MDA-MB-435.

3.1.2 SAHA

Many studies have shown beneficial effects of SAHA in both *in vitro* and *in vivo* models. In BC cell lines, including ER⁺ BC (MCF-7), ER⁺ HER2⁺ (BT-474), HER2⁺ (MDA-MB-453), and TNBC (MDA-MB-231 and 4 T1), antitumoral properties of SAHA (1–10 μ M, 24 h) have been reported, like inhibition of tumor growth and migratory/invasive features [52–54]. Indeed, SAHA can induce apoptosis in MDA-MB-231 cells [55], restore sensitivity to classical drugs in resistant MCF-7 cells [56], improve radiosensitivity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells [53], or overcome Doxorubicin resistance in MCF-7 resistant cells [32]. SAHA treatments have also been shown to improve survival of mice bearing MDA-MB-231 xenografts [57]. Furthermore, it has been shown that SAHA (25 mg/kg, three times a week, during three weeks) can inhibit 4 T1 cell metastasis *in vivo* [53].

As shown earlier, combination of different epigenetic compounds could also provide novel therapeutic solutions to decrease drug concentrations but also to limit acquired resistances to chemical compounds. It is known that HDACs interact with other chromatin modifier proteins, such as lysine-specific demethylase (LSD1), which control histone demethylation. The HDACs/LSD1 complex has been shown to be implicated in BC tumorigenesis [58]. Indeed, the histone demethylation activity of LSD1 is dependent on its interaction with HDACs, and is often associated with inhibition of gene expression. A combination of SAHA with Pargyline, a LSD1 inhibitor, has recently shown promising results in TNBC and HER2⁺ BC by inhibiting their growth [58, 59].

3.1.3 LBH589

LBH589, also known as Panobinostat, is another HDAC inhibitor, efficient against class I, II, and IV within the nanomolar range of concentrations (100 nM, 72 h). It can increase cell death in estrogen sensitive and insensitive BC cells [60], increase the expression of numerous antitumoral genes, and improve survival of mice injected with aggressive TNBC MDA-MB-231 cells [57, 61]. Furthermore, LBH589 can also inhibit the expression of aromatases (implicated in androgens metabolism), and synergize with Letrozole to decrease estrogen levels [62]. These results indicate

419 that the use of LBH589 in patients presenting aggressive BC might
420 be of particular interest since it can be efficient at low concentra-
421 tions and present very few side effects.

422 3.1.4 SNDX-275

423 SNDX-275, also known as Entinostat or MS-275, is a class I HDAC
424 inhibitor. Its use has shown promising preclinical results at low
425 concentrations (0.2–0.5 μM). Indeed, it can induce apoptosis in
426 HER2⁺ BC cell lines (MDA-MB-453 and BT474) with a 1.5 μM
427 treatment, during 24 h [63], but the maximum tolerated doses in
428 patients were about 0.4 μM . The use of SNDX-275 in combina-
429 tion with other compounds might be a hopeful way to use it at
430 lower concentrations. For example, it has been shown that the sen-
431 sitivity to Trastuzumab in Trastuzumab-resistant HER2⁺ BC cell
432 lines is enhanced with a treatment of 0.2 μM of SNDX-275 during
433 96 h while using half the concentration of Trastuzumab [64].
434 SNDX-275 can also restore the sensitivity to the aromatase inhibitor
435 Letrozole, in ER⁻ tumors (MDA-MB-231) in vivo (2.5 mg/kg/day),
436 leading to the inhibition of tumor progression and lung metastasis
437 [65, 66], the reversion of epithelial mesenchymal transition and
438 the inhibition of tumor progression, metastasis, and angiogenesis
439 in the apoptosis-resistant cell line MDA-MB-468 when SNDX-
440 275 (6 mg/kg/day given 4 times with doses of 35 mg/kg) was
441 followed by TRAIL injections [67].

442 These preclinical data have shown that SNDX-275 might have
443 a strong impact on different resistant BC cell lines and therefore
444 could be considered as a future promising tool to treat the most
445 resistant cancers.

445 3.1.5 Valproic Acid

446 Valproic acid (VPA) is an inhibitor of class I and II HDAC activity
447 and can inhibit the growth of both ER⁺ and ER⁻ BC cells (MCF-7
448 and MDA-MB-231) with incubation during 72 h with 10 mM VPA
449 or during 24 h with 250–500 mM VPA [28, 68]. VPA can enhance
450 Tamoxifen efficiency in ER⁺ cell lines (MCF-7, ZR-75-1, T47D)
451 with a 750 μM therapeutic dose for 6–7 days [69]. However, at
452 low-doses (3 μM), VPA could also induce migration and invasion of
453 BC cells [33]. Indeed, VPA alone or in combination with Decitabine
454 induced the expression of *CR-1*, which plays an important role in
455 embryonic development while also regulating various stages of
456 tumor progression, and enhancing MCF-7 invasion and migration
457 abilities, compared to MCF-7 control.

457 3.2 Clinical Trials 458 Using HDAC Inhibitors- 459 Based Protocols

460 Based on the very interesting results observed in preclinical studies

461 3.2.1 TSA

462 In spite of very promising results obtained in preclinical studies,
463 too many side effects were observed with TSA treatments in clinical
464 trials. This compound would then not be used in clinic [70].

t4.1 **Table 4**
t4.2 **Clinical trials designed with HDAC inhibitors-based protocols**

t4.3	Drug	Type of BC targeted	Phase	Status	In combination with	Ref.
t4.4	Panobinostat (LBH 589)	HER2 ⁺	I	Completed	Trastuzumab + Paclitaxel	[98]
t4.5		All	I	Completed	Capecitabine, ± Lapatinib	[99]
t4.6		All	I/II	Suspension of	Letrozole	[100]
t4.7				participants		
t4.8				recruitment		
t4.9		HER2 ⁺ trastuzumab resistant	I/II	Completed	Trastuzumab	[101]
t4.10	TNBC		I/II	Participants	Decitabine, Tamoxifen	[81]
t4.11				recruitment		
t4.12		HER2 ⁺	II	Terminated		[79]
t4.13			= 4 patients			
t4.14	HER2 ⁻	II	Ongoing		[102]	
t4.15	ER ⁺ tamoxifen resistant	0	Terminated		[103]	
t4.16						
t4.17	Entinostat (SNDX-275)	All types of cancers, BC included	I	Completed		[104]
t4.18						
t4.19		HER2 ⁺ trastuzumab resistant	I	Participants	Lapatinib + Trastuzumab	[105]
t4.20				recruitment		
t4.21		ER ⁺ and lung cancers	I	Ongoing	± Exemestane ± Erlotinib	[106]
t4.22		ER ⁺	II	Ongoing	± Exemestane	[107]
t4.23		AI resistant				
t4.24		ER ⁺	II	Completed	Aromatase inhibitors	[108]
t4.25		AI resistant				
t4.26	All	II	Participants	Azacytidine	[78]	
t4.27			recruitment			
t4.28	TNBC	II	Terminated	Anastrozole	[109]	
t4.29	Surgery removable					
t4.30	Vorinostat (SAHA)	All	0	Participants	Hormone therapy	[110]
t4.31				recruitment	(Anastrozole, Letrozole, Exemestane)	
t4.32						
t4.33		AI resistant	0	Completed	Hormone therapy	[111]
t4.34		All	I	Ongoing	Ixabepilone	[112]
t4.35		DCIS	I	Ongoing		[113]
t4.36		All	I/II	Ongoing	Paclitaxel + Bevacizumab	[114]
t4.37		HER2 ⁺	I/II	Completed	Trastuzumab	[115]
t4.38		Newly diagnosed	II	Ongoing	surgery	[116]
t4.39		Surgery removable	II	Ongoing	Paclitaxel albumin-stabilized nanoparticle formulation + Carboplatin	[117]
t4.40						
t4.41						
t4.42	All	II	Completed		[118]	
t4.43	All	II	Completed	Tamoxifen	[119]	
t4.44	All	II	Participants	Lapatinib	[120]	
t4.45			recruitment			
t4.46	Valproic acid (VPA)	All	II	Participants	FEC100	[82]
t4.47			recruitment			
t4.48	CUDC-101	All	I	Completed		[84]

t4.49 *AI* Aromatase inhibitor, *ER* Estrogen receptor, *Status completed* All participants have been recruited, *Status terminated*
t4.50 the study has been stopped early and will not start again

t4.51 Adapted from clinicaltrials.org

464 3.2.2 *Vorinostat=SAHA* For historical reason (first approved by FDA), Vorinostat has been
465 used in the majority of BC clinical studies using epigenetic drugs.
466 But until now, only few studies have been completed and pub-
467 lished. First studies reported various adverse effects of Vorinostat
468 when used alone [71, 72], confirming that its combination with
469 other compounds and a decrease of its concentration would be a
470 better option for its use in therapeutic approaches. Indeed, a phase
471 I trial combining Vorinostat with Doxorubicin, showed that a
472 maximum of 800 mg/day of Vorinostat should be administered to
473 limit side effects, in combination with a weekly dose of Doxorubicin
474 (20 mg/m²) [73]. Another phase I/II trial indicated that Vorinostat
475 could also be combined with Paclitaxel and Bevacizumab. The aim
476 of the phase II of this clinical trial will be to improve the
477 response rate from 40 to 60 % [74]. The study is ongoing. A third
478 study reported that Vorinostat (400 mg/day) combined with
479 Tamoxifen, in ER⁺ endocrine resistant BC, was well tolerated and
480 induced a 40 % clinical benefit after 24 weeks [75]. Finally, a phase
481 I study, combining Decitabine and Vorinostat, has shown pro-
482 longed disease stabilization in different solid tumors [76].

483 3.2.3 *Entinostat* A randomized, placebo-controlled, phase II study has evaluated
484 =*SNDX- 275* the Entinostat (5 mg weekly) effect in combination with the aro-
485 matase inhibitor Exemestane (25 mg daily) versus Exemestane
486 alone [77]. The results have demonstrated that combining
487 Entinostat and Exemestane increased overall survival from 19.8
488 to 28.1 months.
489 Furthermore, a phase II study is currently evaluating the com-
490 bination of two epigenetic modulators: SNDX-275 and Azacytidine
491 in metastatic BC [78].

492 3.2.4 *Panobinostat* Until now, only one clinical trial using Panobinostat alone (with
493 =*LBH589* only four patients included) has been completed and results pub-
494 lished [79]. Panobinostat seems to be a promising tool because of
495 its easy way of administration (oral) and its use at very low concen-
496 trations. The first results showed that this drug presents limiting
497 side effects and can be combined with other drugs (Panobinostat
498 10 mg orally three times weekly in combination with Paclitaxel
499 175 mg/m² and Carboplatin administered intravenously on day 1
500 of every 21-day cycle) [80]. Another phase I/II clinical trial is cur-
501 rently evaluating the combination of Panobinostat with the
502 DNMTi Decitabine and Tamoxifen, in TNBC [81].

503 3.2.5 *Other Clinical Trials* Valproic acid (VPA) has been approved by FDA and can inhibit
504 *Using HDAC Inhibitors* class I and II HDACs. A phase II study is currently recruiting
505 patients to evaluate whether VPA could enhance chemotherapy
506 sensitivity of BC [82], since a phase I study has showed that VPA
507 (140 mg/kg/day for 48 h) could be associated with Epirubicin
508 (100 mg/m²) [83]. Furthermore, another completed phase I study

has evaluated effects and doses to be used with a compound called CUDC-101, which can inhibit EGFR, HER2, and HDACs [84]. The use of multi-target agents could solve problems of resistances often met in single-target therapies. For the moment, multi-target therapies are performed with the combination of different drugs, presenting different pharmacokinetics and toxicity. The use of a single drug with more than one target is a good alternative to prevent the different side effects of multidrug therapies. CUDC-101, contain the structural elements to inhibit HDACs (like Vorinostat) and to inhibit EGFR and HER2 (like Lapatinib). The inhibition of HDACs could modulate various targets, and one of them is the HER family receptor tyrosine kinase pathway, to counteract molecular heterogeneity of cancers and resistances against anti EGFR and HER2 treatments [85].

4 Promising Compounds

The current epigenetic modulators used nowadays are not specific and induce global epigenetic inhibition. Indeed, these compounds usually inhibit for example all the DNMTs for DNMTi, inducing the re-expression of TSG, but can also induce as a consequence the expression of oncogenes, as described above (using Decitabine on MCF-7 cells can induce expression of angiogenic genes in vitro and in vivo [21]). These indirect effects cannot be controlled, because their mechanisms of action are still unknown. First data on DNA methylation have shown that interactions of DNMTs with transcription factors are crucial to induce targeted methylation [86]. In other words, inhibition of a unique DNMT could inhibit an important number of methylated promoters. Therefore, a better knowledge and understanding of the regulation of epigenetics will be needed in the future to improve BC therapy. One of the promising ways of treatment will be personalized medicine, the theranostic. The objective will be in the future to extensively characterize protein, epigenetic and genetic markers of a specific tumor. Therefore to use the best available combination of drugs inducing the best course of treatment but the lowest toxicity and the fewest side effects, as well.

4.1 Natural Compounds

As described earlier, different chemical epigenetic modulators are currently in use in BC clinical trials. However, they present most of the time a high toxicity and many side effects. To reduce toxicity, natural compounds with epigenetic properties (found in food or plants), are currently under research (reviewed in [87]). For example, we can cite curcumin and genistein which are inhibitors of expression of DNMT1, HDAC1 and MeCP2 (a protein that binds specifically to methylated DNA, inhibiting gene expression) [88]. Curcumin has been shown to enhance Tamoxifen sensitivity at

553 2.5 μM concentration in Tamoxifen-resistant MCF-7 cells [89]
554 and genistein purified from soya can inhibit growth of BC xeno-
555 grafts [90].

556 **4.2 Adenosine/ 557 Methionine Cycle**

558 Montenegro MF et al. [91], have reactivated the expression of
559 *RASSF1A*, a tumor suppressor gene, by inhibiting both DNA
560 methylation and the transcription factor E2F1; To do so, the
561 authors used DIPY, an inhibitor of adenosine elimination, in
562 combination with TMEIC, an antifolate to inhibit methionine
563 production. By inhibiting methionine production (substrate of
564 methylases), methylation of proteins and DNA is impossible.
565 Furthermore, adenosine accumulation in the cell results in the
production of an inhibitor of cellular methyltransferases. This treat-
ment has been shown to induce apoptosis of MDA-MB-231 cells.

566 **4.3 miRNA**

567 miRNAs are classified as epigenetic modulators since they speci-
568 cally inhibit the expression of proteins, by interacting with the 3'
569 UTR of pre-mRNA. Numerous studies have shown that miRNA
570 expression pattern is altered in cancers and that they can be consid-
571 ered as biomarkers of BC grades (reviewed in [92]). Most of the
572 time, miRNAs are downregulated in BC compared to normal tis-
573 sues. The delivery of lacking miRNAs in specific patients by differ-
574 ent vectors such as adenoviral vectors, nanoparticles, and lipid-based
575 materials might therefore be a promising new therapeutic protocol
to specifically treat BC.

576 **4.4 Artificial 577 Transcription Factors 578 (ATF)**

579 The major flaw of drugs used in BC treatment is the fact that they
580 are not specific enough. Indeed, HDACs and DNMTs inhibitors
581 induce a general histone acetylation or gene demethylation, with-
582 out being able to control which promoters would be modified.
583 The benefit to use ATF would be to specifically control which pro-
584 moters would be demethylated. ATF used the principle of Zinc-
585 Finger proteins, which could recognize specific sequences. Indeed,
586 ATF contain DNA-Binding Domains (DBD). Each DBD recog-
587 nizes specifically 3 bp, and ATF comprise 6 DBD, to target a highly
588 specific 18 bp sequence. Rivenbark et al. have proven that inducing
589 a specific recruitment of DNMT3a on a promoter is achievable
590 [93], and can induce expression of the targeted gene. Another
591 team using ATF has demonstrated that *Masp1*, a TSG which
silencing is correlating in BC cells with invasive and metastatic
behavior, could be re-expressed in MDA-MB-231 cells, to reduce
tumor growth [94].

592 **5 Conclusion**

593 The development of new therapies to fight BC will be essential in
594 the future to overcome the apparition of resistances to already
595 existing therapies, such as hormonotherapies, but also to find new

compounds that might be efficient to treat TNBC. Epigenetic-based therapies seem to be a good option since the clinical trials already performed present better results than the ones performed with the current existing therapies while presenting very little side effects. Their way of administration is also easier and less invasive for patients (orally for Vorinostat), and they seem to be also efficient on drug-resistant BC cells. Moreover, recent intensive research on gene expression profiles linked to BC cells has led to the development of new emerging patient-specific therapies, such as ATF. These compounds seem to be even more efficient than DNMT and HDAC inhibitors actually used in clinical trials.

References

[AU5]608 1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516

609
610
611
612

613 2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63:11-30. doi:10.3322/caac.21166

614
615

616 3. Antoniou AC, Easton DF (2006) Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25:5898-5905. doi:10.1038/sj.onc.1209879

617
618
619

620 4. Rivenbark AG, O Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.002.

621
622
623
624

625 5. Narod S, Lynch H, Conway T, Watson P, Feunteun J, Lenoir G (1993) Increasing incidence of breast cancer in family with BRCA1 mutation. *Lancet* 341:1101-1102

626
627
628

629 6. Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L, Tommasi S, Pfeifer GP (2003) Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 18:665-677

630
631
632
633
634
635

636 7. Gupta A, Godwin AK, Vanderveer L, Lu A, Liu J (2003) Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63:664-673

637
638
639
640

641 8. Mohamed A, Krajewski K, Cakar B, Ma CX. Targeted therapy for breast cancer. *Am J Pathol*. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.07.005

642
643

644 9. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:R68. doi:10.1186/bcr2635

645
646
647

648
649
650
651
652
653
654
655
656

657 10. Thangavel C, Dean JL, Ertel A, Knudsen KE, Aldaz CM, Witkiewicz AK, Clarke R, Knudsen ES (2011) Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 18:333-345. doi:10.1530/ERC-10-0262

658
659
660
661
662
663

664 11. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A, van der Kwast TH, Sweep CG, Klijn JG (2001) High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 61:5407-5414

665
666
667
668

669 12. Pathiraja TN, Stearns V, Oesterreich S (2010) Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer role in treatment response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:35-47. doi:10.1007/s10911-010-9166-0

670
671
672
673
674
675

676 13. Sharma D, Saxena NK, Davidson NE, Vertino PM (2006) Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes. *Cancer Res* 66:6370-6378. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0402

677
678
679

680 14. Szyf M (2009) Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:243-263. doi:10.1146/annurev-pharmtox-061008-103102

681
682
683
684
685

686 15. Hurtubise A, Momparler RL (2006) Effect of histone deacetylase inhibitor LAQ824 on antineoplastic action of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on human breast carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 58:618-625. doi:10.1007/s00280-006-0225-6

687
688
689

690 16. Bovenzi V, Momparler RL (2001) Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine

- 688 and histone deacetylase inhibitor and their 746
689 effect on the expression of retinoic acid recep- 747
690 tor beta and estrogen receptor alpha genes in 748
691 breast carcinoma cells. *Cancer Chemother* 749
692 *Pharmacol* 48:71-76
- 693 17. Qu Z, Fu J, Yan P, Hu J, Cheng S-Y, Xiao G 750
694 (2010) Epigenetic repression of PDZ-LIM 751
695 domain-containing protein 2 implications for 752
696 the biology and treatment of breast cancer. *J* 753
697 *Biol Chem* 285:11786-11792. doi:10.1074/
698 [jbc.M109.086561](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086561)
- 699 18. Das PM, Thor AD, Edgerton SM, Barry SK, 754
700 Chen DF, Jones FE (2010) Reactivation of 755
701 epigenetically silenced HER4/ERBB4 results 756
702 in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene* 757
703 29:5214-5219. doi:10.1038/[onc.2010.271](https://doi.org/10.1038/onc.2010.271)
- 704 19. Yin X, Xiang T, Li L, Su X, Shu X, Luo X, 758
705 Huang J, Yuan Y, Peng W, Oberst M, Kelly 759
706 K, Ren G, Tao Q (2013) DACT1, an antago- 760
707 nist to Wnt/ β -catenin signaling, suppresses 761
708 tumor cell growth and is frequently silenced 762
709 in breast cancer. *Breast Cancer Res* 15:R23. 763
710 doi:10.1186/[bcr3399](https://doi.org/10.1186/bcr3399)
- 711 20. Borges S, D'ppler H, Perez EA, Andorfer 764
712 CA, Sun Z, Anastasiadis PZ, Thompson EA, 765
713 Geiger XJ, Storz P (2013) Pharmacologic 766
714 reversion of epigenetic silencing of the 767
715 PRKD1 promoter blocks breast tumor cell 768
716 invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 769
717 15:R66. doi:10.1186/[bcr3460](https://doi.org/10.1186/bcr3460)
- 718 21. Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA 770
719 (2008) Pharmacological inhibition of DNA 771
720 methylation induces proinvasive and promet- 772
721 astatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia* 773
722 10:266-278
- 723 22. Singh KP, Treas J, Tyagi T, Gao W (2012) 774
724 DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine 775
725 treatment abrogates 17 β -estradiol- 776
726 induced cell growth and restores expression 777
727 of DNA repair genes in human breast cancer 778
728 cells. *Cancer Lett* 316:62-69. doi:10.1016/[j.canlet.2011.10.022](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.022)
- 729 23. Di Cello F, Cope L, Li H, Jeschke J, Wang W, 784
730 Baylin SB, Zahnow CA (2013) Methylation 785
731 of the claudin 1 promoter is associated with 786
732 loss of expression in estrogen receptor posi- 787
733 tive breast cancer. *PLoS ONE* 8:e68630. 788
734 doi:10.1371/[journal.pone.0068630](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068630)
- 735 24. Zeng L, Jarrett C, Brown K, Gillespie KM, 789
736 Holly JMP, Perks CM (2013) Insulin-like 790
737 growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) 791
738 plays a role in the anti-tumorigenic effects of 792
739 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) in breast can- 793
740 cer cells. *Exp Cell Res* 319:2282-2295. 794
741 doi:10.1016/[j.yexcr.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.011)
- 742 25. Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson 795
743 WG, Herman JG, Davidson NE (2001) 796
744 Synergistic activation of functional estrogen 797
745 receptor (ER)- α by DNA methyltransferase 798
and histone deacetylase inhibition in human 799
ER- α -negative breast cancer cells. *Cancer Res* 800
61:7025-7029
26. Ari F, Napieralski R, Ulukaya E, Dere E, 801
Colling C, Honert K, Krüger A, Kiechle M, 802
Schmitt M (2011) Modulation of protein 803
expression levels and DNA methylation status 804
of breast cancer metastasis genes by 805
anthracycline-based chemotherapy and the 806
demethylating agent decitabine. *Cell Biochem* 807
Funct 29:651-659. doi:10.1002/[cbf.1801](https://doi.org/10.1002/cbf.1801)
27. Pryzbylowski P, Obajimi O, Keen JC (2008) 808
Trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine 809
decrease estrogen receptor mRNA stability in 810
ER positive MCF7 cells through modulation 811
of HuR. *Breast Cancer Res Treat* 111:15-25. 812
doi:10.1007/[s10549-007-9751-0](https://doi.org/10.1007/s10549-007-9751-0)
28. Jawaid K, Crane SR, Nowers JL, Lacey M, 813
Whitehead SA (2010) Long-term genistein 814
treatment of MCF-7 cells decreases acety- 815
lated histone 3 expression and alters growth 816
responses to mitogens and histone deacety- 817
lase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 818
120:164-171. doi:10.1016/[j.jsbmb.2010.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.04.007)
29. Sandhu R, Rivenbark AG, Coleman WB (2012) 819
Enhancement of chemotherapeutic efficacy in 820
hypermethylator breast cancer cells through 821
targeted and pharmacologic inhibition of 822
DNMT3b. *Breast Cancer Res Treat* 131:3 823
85-399. doi:10.1007/[s10549-011-1409-2](https://doi.org/10.1007/s10549-011-1409-2)
30. Mirza S, Sharma G, Pandya P, Ralhan R 824
(2010) Demethylating agent 5-aza-2'- 825
deoxycytidine enhances susceptibility of 826
breast cancer cells to anticancer agents. *Mol* 827
Cell Biochem 342:101-109. doi:10.1007/[s11010-010-0473-y](https://doi.org/10.1007/s11010-010-0473-y)
31. Vijayaraghavalu S, Peetla C, Lu S, Labhasetwar 828
V (2012) Epigenetic modulation of the bio- 829
physical properties of drug-resistant cell lipids 830
to restore drug transport and endocytic func- 831
tions. *Mol Pharm* 9:2730-2742. doi:10.1021/[mp300281t](https://doi.org/10.1021/mp300281t)
32. Vijayaraghavalu S, Dermawan JK, Cheriyaath 832
V, Labhasetwar V (2013) Highly synergistic 833
effect of sequential treatment with epigenetic 834
and anticancer drugs to overcome drug resis- 835
tance in breast cancer cells is mediated via 836
activation of p21 gene expression leading to 837
G2/M cycle arrest. *Mol Pharm* 10:337-352. 838
doi:10.1021/[mp3004622](https://doi.org/10.1021/mp3004622)
33. Bianco C, Castro NP, Baraty C, Rollman K, 839
Held N, Rangel MC, Karasawa H, Gonzales 840
M, Strizzi L, Salomon DS (2013) Regulation 841
of human Cripto-1 expression by nuclear 842
receptors and DNA promoter methylation 843
in human embryonal and breast cancer cells. 844

- 804 J Cell Physiol 228:1174–1188. doi:[10.1002/](https://doi.org/10.1002/jcp.24271)
805 [jcp.24271](https://doi.org/10.1002/jcp.24271)
- 806 34. Stone A, Vald s-Mora F, Gee JMW, Farrow 864
807 L, McClelland RA, Fiegl H, Dutkowski C, 865
808 McCloy RA, Sutherland RL, Musgrove EA, 866
809 Nicholson RI (2012) Tamoxifen-induced epi- 867
810 genetic silencing of oestrogen-regulated 868
811 genes in anti-hormone resistant breast cancer. 869
812 PLoS ONE 7:e40466. doi:[10.1371/journal.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040466)
813 [pone.0040466](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040466)
- 814 35. Thakur S, Feng X, Qiao Shi Z, Ganapathy A, 870
815 Kumar Mishra M, Atadja P, Morris D, 871
816 Riabowol K (2012) INGI and 5-azacytidine 872
817 act synergistically to block breast cancer cell 873
818 growth. PLoS One 7:e43671. doi:[10.1371/](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043671)
819 [journal.pone.0043671](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043671)
- 820 36. Tikoo K, Ali IY, Gupta J, Gupta C (2009) 874
821 5-Azacytidine prevents cisplatin induced 875
822 nephrotoxicity and potentiates anticancer 876
823 activity of cisplatin by involving inhibition of 877
824 metallothionein, pAKT and DNMT1 expres- 878
825 sion in chemical induced cancer rats. Toxicol 879
826 Lett 191:158–166. doi:[10.1016/j.toxlet.](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.018)
827 [2009.08.018](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.018)
- 828 37. Weber J (2002) NCT00030615. Decitabine 880
829 in treating patients with advanced solid 881
830 tumors. In: clinicaltrials.org
- 831 38. Aparicio A, Eads CA, Leong LA, Laird PW, 882
832 Newman EM, Synold TW, Baker SD, Zhao 883
833 M, Weber JS (2003) Phase I trial of con- 884
834 tinuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine. 885
835 Cancer Chemother Pharmacol 51:231–239. 886
836 doi:[10.1007/s00280-002-0563-y](https://doi.org/10.1007/s00280-002-0563-y)
- 837 39. Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, 887
838 McCormick C, Strathdee G, Lee C, Barrett S, 888
839 Reade S, Jadayel D, Tang A, Bellenger K, 889
840 Mackay L, Setanoians A, Sch tzlein A, 890
841 Twelves C, Kaye SB, Brown R (2007) Phase I 891
842 and pharmacodynamic trial of the DNA 892
843 methyltransferase inhibitor decitabine and 893
844 carboplatin in solid tumors. J Clin Oncol Off 894
845 J Am Soc Clin Oncol 25:4603–4609. 895
846 doi:[10.1200/JCO.2007.10.8688](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.10.8688)
- 847 40. Khong HT (2008) NCT00748553. A phase 896
848 I/II clinical trial of vidaza with abraxane in 897
849 the treatment of patients with advanced or 898
850 metastatic solid tumors and breast cancer 899
851 (VA). In: clinicaltrials.org
- 852 41. Feng W, Lu Z, Luo RZ, Zhang X, Seto E, 900
853 Liao WS-L, Yu Y (2007) Multiple histone 901
854 deacetylases repress tumor suppressor gene 902
855 ARHI in breast cancer. Int J Cancer 903
856 120:1664–1668. doi:[10.1002/ijc.22474](https://doi.org/10.1002/ijc.22474)
- 857 42. Yarosh W, Barrientos T, Esmailpour T, Lin L, 904
858 Carpenter PM, Osann K, Anton-Culver H, 905
859 Huang T (2008) TBX3 is overexpressed in 906
860 breast cancer and represses p14 ARF by inter- 907
861 acting with histone deacetylases. Cancer Res 908
909 68:693–699. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5012)
910 [07-5012](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5012)
- 911 43. Chakravarty G, Rider B, Mondal D (2011) 912
912 Cytoplasmic compartmentalization of SOX9 913
913 abrogates the growth arrest response of breast 914
914 cancer cells that can be rescued by trichostatin 915
915 A treatment. Cancer Biol Ther 11:71–83. 916
916 doi:[10.4161/cbt.11.1.13952](https://doi.org/10.4161/cbt.11.1.13952)
- 917 44. Kim S-H, Kang H-J, Na H, Lee M-O (2010) 917
918 Trichostatin A enhances acetylation as well as 918
919 protein stability of ERalpha through induc- 919
920 tion of p300 protein. Breast Cancer Res 920
921 12:R22. doi:[10.1186/bcr2562](https://doi.org/10.1186/bcr2562)
- 922 45. Reid G, M tivier R, Lin C-Y, Denger S, 922
923 Ibberson D, Ivacevic T, Brand H, Benes V, 923
924 Liu ET, Gannon F (2005) Multiple mecha- 924
925 nisms induce transcriptional silencing of a sub- 925
926 set of genes, including oestrogen receptor 926
927 alpha, in response to deacetylase inhibition by 927
928 valproic acid and trichostatin A. Oncogene 928
929 24:4894–4907. doi:[10.1038/sj.onc.1208662](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208662)
- 930 46. Jang ER, Lim S-J, Lee ES, Jeong G, Kim T-Y, 929
931 Bang Y-J, Lee J-S (2003) The histone deacet- 930
932 ylase inhibitor trichostatin A sensitizes estro- 931
933 gen receptor α -negative breast cancer cells 932
934 to tamoxifen. Oncogene 23:1724–1736. 933
935 doi:[10.1038/sj.onc.1207315](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207315)
- 936 47. Collins-Burow B (2011) The histone deacet- 934
937 ylase inhibitor trichostatin A alters microRNA 935
938 expression pro les in apoptosis-resistant 936
939 breast cancer cells. Oncol Rep. doi:[10.3892/](https://doi.org/10.3892/or.2011.1488)
940 [or.2011.1488](https://doi.org/10.3892/or.2011.1488)
- 941 48. Tu Z, Li H, Ma Y, Tang B, Tian J, Akers W, 937
942 Achilefu S, Gu Y (2012) The enhanced antip- 938
943 roliferative response to combined treatment of 939
944 trichostatin A with raloxifene in MCF-7 breast 940
945 cancer cells and its relevance to estrogen 941
946 receptor β expression. Mol Cell Biochem 366: 942
947 111–122. doi:[10.1007/s11010-012-1288-9](https://doi.org/10.1007/s11010-012-1288-9)
- 948 49. Pitta CA, Papageorgis P, Charalambous C, 943
949 Constantinou AI (2013) Reversal of ER- β 944
950 silencing by chromatin modifying agents 945
951 overrides acquired tamoxifen resistance. 946
952 Cancer Lett 337:167–176. doi:[10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.031)
953 [canlet.2013.05.031](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.031)
- 954 50. Hostetter CL, Licata LA, Keen JC (2009) 947
955 Timing is everything: Order of administra- 948
956 tion of 5-aza 2'-deoxycytidine, trichostatin A 949
957 and tamoxifen changes estrogen receptor 950
958 mRNA expression and cell sensitivity. Cancer 951
959 Lett 275:178–184. doi:[10.1016/j.canlet.](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.005)
960 [2008.10.005](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.005)
- 961 51. Fan J, Yin W-J, Lu J-S, Wang L, Wu J, Wu 952
962 F-Y, Di G-H, Shen Z-Z, Shao Z-M (2008) 953
963 ER alpha negative breast cancer cells restore 954
964 response to endocrine therapy by combina- 955
965 tion treatment with both HDAC inhibitor 956
966 and DNMT inhibitor. J Cancer Res Clin 957
967 162:1171–1176. doi:[10.1007/s12094-008-0008-4](https://doi.org/10.1007/s12094-008-0008-4)

- 920 Oncol 134:883-890. doi:[10.1007/s00432-](https://doi.org/10.1007/s00432-008-0354-x)
921 [008-0354-x](https://doi.org/10.1007/s00432-008-0354-x)
- 922 52. Hung W-C (2012) Inhibition of lymphangiogenic factor VEGF-C expression and production by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in breast cancer cells. *Oncol Rep.* doi:[10.3892/or.2012.2188](https://doi.org/10.3892/or.2012.2188)
- 923
924
925
926
927
- 928 53. Chiu H-W, Yeh Y-L, Wang Y-C, Huang W-J, Chen Y-A, Chiou Y-S, Ho S-Y, Lin P, Wang Y-J (2013) Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, enhances radiosensitivity and suppresses lung metastasis in breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 8:e76340. doi:[10.1371/journal.pone.0076340](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076340)
- 929
930
931
932
933
934
935
- 936 54. Eades G, Yang M, Yao Y, Zhang Y, Zhou Q (2011) miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J Biol Chem* 286:40725-40733. doi:[10.1074/jbc.M111.275495](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275495)
- 937
938
939
940
- 941 55. Bellarosa D, Bressan A, Bigioni M, Parlani M, Maggi CA, Binaschi M (2012) SAHA/Vorinostat induces the expression of the CD137 receptor/ligand system and enhances apoptosis mediated by soluble CD137 receptor in a human breast cancer cell line. *Int J Oncol* 41:1486-1494. doi:[10.3892/ijo.2012.1551](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1551)
- 942
943
944
945
946
947
- 948 56. Lu S, Labhassetwar V (2013) Drug resistant breast cancer cell line displays cancer stem cell phenotype and responds sensitively to epigenetic drug SAHA. *Drug Deliv Transl Res* 3:183-194. doi:[10.1007/s13346-012-0113-z](https://doi.org/10.1007/s13346-012-0113-z)
- 949
950
951
952
- 953 57. Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L, Smith JE, Hembruff SL, Ha K, Atadja P, Bhalla KN (2012) Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 11:973-983. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-11-0979](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0979)
- 954
955
956
957
958
959
960
961
- 962 58. Huang Y, Vasilatos SN, Boric L, Shaw PG, Davidson NE (2012) Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 131:777-789. doi:[10.1007/s10549-011-1480-8](https://doi.org/10.1007/s10549-011-1480-8)
- 963
964
965
966
967
968
- 969 59. Vasilatos SN, Katz TA, Oesterreich S, Wan Y, Davidson NE, Huang Y (2013) Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 34:1196-1207. doi:[10.1093/carcin/bgt033](https://doi.org/10.1093/carcin/bgt033)
- 970
971
972
973
974
975
- 976 60. Fortunati N, Catalano MG, Marano F, Mugoni V, Pugliese M, Bosco O, Mainini F, Boccuzzi G (2010) The pan-DAC inhibitor LBH589 is a multi-functional agent in breast cancer cells: cytotoxic drug and inducer of sodium-iodide symporter (NIS). *Breast Cancer Res Treat* 124:667-675. doi:[10.1007/s10549-010-0789-z](https://doi.org/10.1007/s10549-010-0789-z)
- 977
978
979
980
981
982
983
- 984 61. Tate CR, Rhodes LV, Segar HC, Driver JL, Pounder FN, Burow ME, Collins-Burow BM (2012) Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. *Breast Cancer Res* 14:R79. doi:[10.1186/bcr3192](https://doi.org/10.1186/bcr3192)
- 985
986
987
988
989
- 990 62. Chen S, Ye J, Kijima I, Evans D (2010) The HDAC inhibitor LBH589 (panobinostat) is an inhibitory modulator of aromatase gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 107:11032-11037. doi:[10.1073/pnas.1000917107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000917107)
- 991
992
993
994
- 995 63. Wang S, Huang J, Lyu H, Lee C-K, Tan J, Wang J, Liu B (2013) Functional cooperation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Death Dis* 4:e556. doi:[10.1038/cddis.2013.79](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.79)
- 996
997
998
999
1000
1001
- 1002 64. Huang X, Wang S, Lee C-K, Yang X, Liu B (2011) HDAC inhibitor SNDX-275 enhances efficacy of trastuzumab in erbB2-overexpressing breast cancer cells and exhibits potential to overcome trastuzumab resistance. *Cancer Lett* 307:72-79. doi:[10.1016/j.canlet.2011.03.019](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.03.019)
- 1003
1004
1005
1006
1007
1008
- 1009 65. Sabnis GJ, Goloubeva O, Chumsri S, Nguyen N, Sukumar S, Brodie AMH (2011) Functional activation of the estrogen receptor- α and aromatase by the HDAC inhibitor entinostat sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Res* 71:1893-1903. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-10-2458](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2458)
- 1010
1011
1012
1013
1014
1015
- 1016 66. Chumsri S, Sabnis GJ, Howes T, Brodie AMH (2011) Aromatase inhibitors and xenograft studies. *Steroids* 76:730-735. doi:[10.1016/j.steroids.2011.02.033](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.033)
- 1017
1018
1019
- 1020 67. Srivastava RK, Kurzrock R, Shankar S (2010) MS-275 sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelial-mesenchymal transition in vivo. *Mol Cancer Ther* 9:3254-3266. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-10-0582](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0582)
- 1021
1022
1023
1024
1025
1026
- 1027 68. Olsen CM, Meussen-Elholm ETM, Røste LS, Taubøll E (2004) Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7. *Mol Cell Endocrinol* 213:173-179. doi:[10.1016/j.mce.2003.10.032](https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.032)
- 1028
1029
1030
1031
- 1032 69. Hodges-Gallagher L, Valentine CD, Bader SE, Kushner PJ (2007) Inhibition of histone deacetylase enhances the anti-proliferative action of antiestrogens on breast cancer cells
- 1033
1034
1035

- 1036 and blocks tamoxifen-induced proliferation of
1037 uterine cells. *Breast Cancer Res Treat* 105:
1038 297-309. doi:10.1007/s10549-006-9459-6
- 1039 70. Rodríguez-Paredes M, Esteller M (2011)
1040 Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.
1041 *Nat Med* 17:330-339. doi:10.1038/nm.2305
1042
- 1043 71. Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H,
1044 Chen C, Ricker JL, Randolph SS, Schiffski P
1045 (2008) Early phase II trial of oral Vorinostat
1046 in relapsed or refractory breast, colorectal, or
1047 non-small cell lung cancer. *Invest New
1048 Drugs* 26:483-488. doi:10.1007/s10637-
1049 008-9131-6
- 1050 72. Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D,
1051 McNamara M, Portnow J, Frankel P, Smith
1052 DD, Doroshow JH, Gandara DR, Aparicio A,
1053 Somlo G, Wong C (2008) A phase II trial of
1054 Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid)
1055 in metastatic breast cancer: a California Cancer
1056 Consortium study. *Clin Cancer Res* 14:
1057 7138-7142. doi:10.1158/1078-0432.CCR-
1058 08-0122
- 1059 73. Munster PN, Marchion D, Thomas S, Egorin
1060 M, Minton S, Springett G, Lee J-H, Simon
1061 G, Chiappori A, Sullivan D, Daud A (2009)
1062 Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in
1063 solid tumors: histone deacetylase 2 expres-
1064 sion as a predictive marker. *Br J Cancer* 101:
1065 1044-1050. doi:10.1038/sj.bjc.6605293
- 1066 74. Ramaswamy B, Fiskus W, Cohen B, Pellegrino
1067 C, Hershman DL, Chuang E, Luu T, Somlo
1068 G, Goetz M, Swaby R, Shapiro CL, Stearns V,
1069 Christos P, Espinoza-Delgado I, Bhalla K,
1070 Sparano JA (2011) Phase I/II study of vorinostat
1071 plus paclitaxel and bevacizumab in
1072 metastatic breast cancer: evidence for
1073 vorinostat-induced tubulin acetylation and
1074 Hsp90 inhibition in vivo. *Breast Cancer Res
1075 Treat* 132:1063-1072. doi:10.1007/s10549-
1076 011-1928-x
- 1077 75. Munster PN, Thurn KT, Thomas S, Raha P,
1078 Lacevic M, Miller A, Melisko M, Ismail-Khan
1079 R, Rugo H, Moasser M, Minton SE (2011) A
1080 phase II study of the histone deacetylase
1081 inhibitor vorinostat combined with tamoxifen
1082 for the treatment of patients with hormone
1083 therapy-resistant breast cancer. *Br J Cancer*
1084 104:1828-1835. doi:10.1038/bjc.2011.156
- 1085 76. Stathis A, Hotte SJ, Chen EX, Hirte HW, Oza
1086 AM, Moretto P, Webster S, Laughlin A,
1087 Stayner L-A, McGill S, Wang L, Zhang W,
1088 Espinoza-Delgado I, Holleran JL, Egorin MJ,
1089 Siu LL (2011) Phase I study of decitabine in
1090 combination with vorinostat in patients with
1091 advanced solid tumors and non-Hodgkin's
1092 lymphomas. *Clin Cancer Res* 17:1582-1590.
1093 doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1893
77. Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B,
Lichinitser M, Munster PN, Klein PM,
Cruickshank S, Miller KD, Lee MJ, Trepel JB
(2013) Randomized phase II, double-blind,
placebo-controlled study of exemestane with
or without entinostat in postmenopausal
women with locally recurrent or metastatic
estrogen receptor-positive breast cancer pro-
gressing on treatment with a nonsteroidal
aromatase inhibitor. *J Clin Oncol Off J Am
Soc Clin Oncol* 31:2128-2135. doi:10.1200/
JCO.2012.43.7251
78. Stearns V (2011) NCT01349959. Azacitidine
and entinostat in treating patients with
advanced breast cancer. In: *clinicaltrials.org*
79. Finn R (2008) NCT00777335. Study of pan-
obinostat monotherapy in women with
v-ERB-B2 avian erythroblastic leukemia virally
oncogene homolog 2 (HER2) positive locally
recurrent or metastatic breast cancer. In: *clinicaltrials.org*
80. Jones SF, Infante JR, Thompson DS,
Mohyuddin A, Bendell JC, Yardley DA,
Burriss HA 3rd (2012) A phase I trial of oral
administration of panobinostat in combina-
tion with paclitaxel and carboplatin in patients
with solid tumors. *Cancer Chemother
Pharmacol* 70:471-475. doi:10.1007/s00280-
012-1931-x
81. O'Regan R (2010) NCT01194908.
Re-expression of ER in triple negative breast
cancers. In: *clinicaltrials.org*
82. Munster P (2009) NCT01010854. Valproic
acid in combination with FEC100 for pri-
mary therapy in patients with breast cancer
(VPA-FEC100). In: *clinicaltrials.org*
83. Munster P, Marchion D, Bicaku E, Schmitt
M, Lee JH, DeConti R, Simon G, Fishman
M, Minton S, Garrett C, Chiappori A, Lush
R, Sullivan D, Daud A (2007) Phase I trial of
histone deacetylase inhibition by valproic acid
followed by the topoisomerase II inhibitor
epirubicin in advanced solid tumors: a clinical
and translational study. *J Clin Oncol Off J Am
Soc Clin Oncol* 25:1979-1985. doi:10.1200/
JCO.2006.08.6165
84. (2010) NCT01171924. A phase Ib expan-
sion study investigating the safety, efficacy,
and pharmacokinetics of intravenous CUDC-
101 in subjects with advanced head and neck,
gastric, breast, liver and non-small cell lung
cancer tumors. In: *clinicaltrials.org*
85. Lai C-J, Bao R, Tao X, Wang J, Atoyan R, Qu
H, Wang D-G, Yin L, Samson M, Forrester J,
Zifcak B, Xu G-X, DellaRocca S, Zhai H-X,
Cai X, Munger WE, Keegan M, Pepicelli CV,
Qian C (2010) CUDC-101, a multitargeted
inhibitor of histone deacetylase, epidermal

- 1152 growth factor receptor, and human epidermal
1153 growth factor receptor 2, exerts potent anti-
1154 cancer activity. *Cancer Res* 70:3647 3656.
1155 doi:[10.1158/0008-5472.CAN-09-3360](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3360)
- 1156 86. Hervouet E, Vallette FM, Cartron P-F (2009)
1157 Dnmt3/transcription factor interactions as
1158 crucial players in targeted DNA methylation.
1159 *Epigenetics* 4:487 499
- 1160 87. Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA,
1161 Dasmahapatra AK (2012) Epigenetic events
1162 associated with breast cancer and their pre-
1163 vention by dietary components targeting the
1164 epigenome. *Chem Res Toxicol* 25:61 73.
1165 doi:[10.1021/tx200378c](https://doi.org/10.1021/tx200378c)
- 1166 88. Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD,
1167 Pandya P, Ralhan R (2013) Expression of
1168 DNA methyltransferases in breast cancer
1169 patients and to analyze the effect of natural
1170 compounds on dna methyltransferases and
1171 associated proteins. *J Breast Cancer* 16:23
1172 31. doi:[10.4048/jbc.2013.16.1.23](https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.1.23)
- 1173 89. Jiang M, Huang O, Zhang X, Xie Z, Shen A,
1174 Liu H, Geng M, Shen K (2013) Curcumin
1175 induces cell death and restores tamoxifen sen-
1176 sitivity in the antiestrogen-resistant breast
1177 cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/
1178 LCC9. *Molecules* 18:701 720. doi:[10.3390/
1179 molecules18010701](https://doi.org/10.3390/molecules18010701)
- 1180 90. Li Y, Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO
1181 (2013) Epigenetic regulation of multiple
1182 tumor-related genes leads to suppression of
1183 breast tumorigenesis by dietary genistein.
1184 *PLoS One* 8:e54369. doi:[10.1371/journal.
1185 pone.0054369](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054369)
- 1186 91. Montenegro MF, Sez-Ayala M, Pi-ero-
1187 Madrona A, Cabezas-Herrera J, Rodr'guez-
1188 L-pez JN (2012) Reactivation of the tumour
1189 suppressor RASSF1A in breast cancer by simul-
1190 taneous targeting of DNA and E2F1 meth-
1191 ylation. *PLoS One* 7:e52231. doi:[10.1371/
1192 journal.pone.0052231](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052231)
- 1193 92. Liu H (2012) MicroRNAs in breast cancer
1194 initiation and progression. *Cell Mol Life
1195 Sci*69:3587 3599. doi:[10.1007/s00018-012-
1196 1128-9](https://doi.org/10.1007/s00018-012-1128-9)
- 1197 93. Rivenbark AG, Stolzenburg S, Beltran AS,
1198 Yuan X, Rots MG, Strahl BD, Blancafort P
1199 (2012) Epigenetic reprogramming of cancer
1200 cells via targeted DNA methylation.
1201 *Epigenetics* 7:350 360. doi:[10.4161/epi.
1202 19507](https://doi.org/10.4161/epi.19507)
- 1203 94. Beltran AS, Russo A, Lara H, Fan C, Lizardi
1204 PM, Blancafort P (2011) Suppression of breast
1205 tumor growth and metastasis by an engineered
1206 transcription factor. *PLoS ONE* 6:e24595.
1207 doi:[10.1371/journal.pone.0024595](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024595)
- 1208 95. Holliday DL, Speirs V (2011) Choosing the
1209 right cell line for breast cancer research.
1210 *Breast Cancer Res* 13:215. doi:[10.1186/
1211 bcr2889](https://doi.org/10.1186/bcr2889)
- 1212 96. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner
1213 FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe J-P,
1214 Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S,
1215 Lapuk A, Wang NJ, Kuo W-L, Stilwell JL,
1216 Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM,
1217 McCormick F, Dickson RB, Johnson MD,
1218 Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW
1219 (2006) A collection of breast cancer cell lines
1220 for the study of functionally distinct cancer
1221 subtypes. *Cancer Cell* 10:515 527.
1222 doi:[10.1016/j.ccr.2006.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008)
- 1223 97. Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacety-
1224 lase inhibitors and the promise of epigenetic
1225 (and more) treatments for cancer. *Nat Rev
1226 Cancer* 6:38 51. doi:[10.1038/nrc1779](https://doi.org/10.1038/nrc1779)
- 1227 98. Novartis Pharmaceuticals (2008)
1228 NCT00788931. A trial I of panobinostat
1229 given in combination with trastuzumab and
1230 paclitaxel in adult female patients with HER2
1231 positive metastatic breast cancer. In: clinical-
1232 trials.org
- 1233 99. Burris HA (2008) NCT00632489. LBH589
1234 in combination with capecitabine plus/minus
1235 (\pm) lapatinib in breast cancer patients. In: clin-
1236 icaltrials.org
- 1237 100. Tan W (2010) NCT01105312. Panobinostat
1238 and letrozole in treating patients with meta-
1239 static breast cancer. In: clinicaltrials.org
- 1240 101. Pharmaceuticals N (2007) NCT00567879. A
1241 trial of panobinostat and trastuzumab for
1242 adult female patients with HER2 positive
1243 metastatic breast cancer whose disease has
1244 progressed on or after trastuzumab. In: clin-
1245 icaltrials.org
- 1246 102. Hurvitz S (2008) NCT00777049. Study of
1247 panobinostat monotherapy in women with
1248 HER2 negative locally recurrent or metastatic
1249 breast cancer. In: clinicaltrials.org
- 1250 103. Collins-Burow B (2009) NCT00993642.
1251 ERB-B4 after treatment with HDAC inhibitor
1252 in ER + tamoxifen refractory breast cancer.
1253 In: clinicaltrials.org
- 1254 104. Kummar S (2001) NCT00020579. MS-275
1255 in treating patients with advanced solid
1256 tumors or lymphoma. In: clinicaltrials.org
- 1257 105. Ueno N (2011) NCT01434303. Entinostat,
1258 lapatinib ditosylate and trastuzumab in
1259 patients with locally recurrent or distant
1260 relapsed metastatic breast cancer previously
1261 treated with trastuzumab only. In: clinicaltri-
1262 als.org
- 1263 106. McCulloch W (2012) NCT01594398. Study
1264 to assess food effect on pharmacokinetics of
1265 entinostat in subjects with breast cancer or
1266 non-small cell lung cancer (ENCORE110).
1267 In: clinicaltrials.org

1268	107. Yardley D (2008) NCT00676663. Study to	114. Sparano J (2006) NCT00368875. Vorinostat,	1298
1269	evaluate exemestane with and without SNDX-	paclitaxel, and bevacizumab in treating	1299
1270	275 in treatment of postmenopausal women	patients with metastatic breast cancer and/or	1300
1271	with advanced breast cancer (ENCORE301).	breast cancer that has recurred in the chest	1301
1272	In: clinicaltrials.org	wall and cannot be removed by surgery. In:	1302
1273	108. Pharmaceuticals S (2009) NCT00828854. A	clinicaltrials.org	1303
1274	phase 2, multicenter study of the effect of the	115. Swaby R (2005) NCT00258349. Vorinostat	1304
1275	addition of SNDX-275 to continued aroma-	and trastuzumab in treating patients with	1305
1276	tase inhibitor (AI) therapy in postmenopausal	metastatic or locally recurrent breast cancer.	1306
1277	women With ER + breast cancer whose dis-	In: clinicaltrials.org	1307
1278	ease is progressing. In: clinicaltrials.org	116. Stearns V (2005) NCT00262834. Vorinostat	1308
1279	109. Chumsri S (2010) NCT01234532.	in treating women who are undergoing sur-	1309
1280	Entinostat and anastrozole in treating post-	gery for newly diagnosed stage I, stage II, or	1310
1281	menopausal women with triple-negative	stage III breast cancer. In: clinicaltrials.org	1311
1282	breast cancer that can be removed by surgery.	117. Stearns V (2008) NCT00616967. Carboplatin	1312
1283	In: clinicaltrials.org	and paclitaxel albumin-stabilized nanoparticle	1313
1284	110. Linden H (2012) NCT01720602. Vorinostat	formulation with or without vorinostat in	1314
1285	in treating patients with stage IV breast can-	treating women with breast cancer that can be	1315
1286	cer receiving hormone therapy. In: clinicaltri-	removed by surgery. In: clinicaltrials.org	1316
1287	als.org	118. Luu T (2005) NCT00132002. Suberoylanilide	1317
1288	111. Linden H (2010) NCT01153672. Vorinostat	hydroxamic acid in treating patients with pro-	1318
1289	in treating patients with stage IV breast can-	gressive stage IV breast cancer. In: clinicaltri-	1319
1290	cer receiving aromatase inhibitor therapy. In:	als.org	1320
1291	clinicaltrials.org	119. Minton S (2006) NCT00365599. Phase II	1321
1292	112. Luu T (2010) NCT01084057. Ixabepilone	trial of SAHA & tamoxifen for patients with	1322
1293	and vorinostat in treating patients with meta-	breast cancer. In: clinicaltrials.org	1323
1294	static breast cancer. In: clinicaltrials.org	120. Chumsri S (2010) NCT01118975. Vorinostat	1324
1295	113. Esserman L (2008) NCT00788112. orino-	and lapatinib in advanced solid tumors and	1325
1296	stat in treating women with ductal carcinoma	advanced breast cancer to evaluate response	1326
1297	in situ of the breast. In: clinicaltrials.org	and biomarkers. In: clinicaltrials.org	1327

BIBLIOGRAPHIE

- Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U & Kelekar A (2007) Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* **14**: 500–510
- Agarraberes FA & Dice JF (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell Sci.* **114**: 2491–2499
- 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
- Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Lopez-Berestein G, Zhang D, Ueno NT, Hortobagyi GN & Arun B (2010) Targeting p70S6K prevented lung metastasis in a breast cancer xenograft model. *Mol. Cancer Ther.* **9**: 1180–1187
- Albanesi J, Wang H, Sun H-Q, Levine B & Yin H (2015) GABARAP-mediated targeting of PI4K2A/PI4KII α to autophagosomes regulates PtdIns4P-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **11**: 2127–2129
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S & Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 2–11
- Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP & Mayer A (2008) Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res.* **68**: 1485–1494
- Aubele M, Spears M, Ludyga N, Braselmann H, Feuchtinger A, Taylor KJ, Lindner K, Auer G, Stering K, Höfler H, Schmitt M & Bartlett JMS (2010) In situ quantification of HER2–protein tyrosine kinase 6 (PTK6) protein–protein complexes in paraffin sections from breast cancer tissues. *Br. J. Cancer* **103**: 663–667
- Autier P, Boniol M, La Vecchia C, LaVecchia C, Vatten L, Gavin A, Héry C & Heanue M (2010) Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ* **341**: c3620
- 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
- Bacon AL, Fox S, Turley H & Harris AL (2007) Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene BNIP3 by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer. *Oncogene* **26**: 132–141
- Bai H, Inoue J, Kawano T & Inazawa J (2012) A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene* **31**:

4397–4408

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281–297

Barth S, Glick D & Macleod KF (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* **221**: 117–124

Basu B, Dean E, Puglisi M, Greystoke A, Ong M, Burke W, Cavallin M, Bigley G, Womack C, Harrington EA, Green S, Oelmann E, de Bono JS, Ranson M & Banerji U (2015) First-in-Human Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Dual m-TORC 1/2 Inhibitor AZD2014. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**: 3412–3419

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

Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JDF, Feuer EJ & Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators (2005) Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1784–1792

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

Bertout JA, Patel SA & Simon MC (2008) The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 967–975

Bingle L, Brown NJ & Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* **196**: 254–265

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**: 6–21

Birgisdottir ÁB, Lamark T & Johansen T (2013) The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* **126**: 3237–3247

Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T & Brumell JH (2006) Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* **281**: 11374–11383

Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S & Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**: 1760–1764

Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, Métivier 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, Bôle-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, Chakrama F-Z, 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

Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török 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

Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61–70

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P & Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**: 1056–1060

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

Chan EYW, Longatti A, McKnight NC & Tooze SA (2009) Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 157–171

Chen C, Li J-G, Chen Y, Huang P, Wang Y & Liu-Chen L-Y (2006) GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J. Biol. Chem.* **281**: 7983–7993

Chen N & Karantza V (2011) Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol. Ther.* **11**: 157–168

Chen Y, Azad MB & Gibson SB (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* **16**: 1040–1052

Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ & Gibson SB (2007) Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J. Cell Sci.* **120**: 4155–4166

Cheray M, Nadaradjane A, Bonnet P, Routier S, Vallette FM & Cartron P-F (2014) Specific inhibition of DNMT1/CFP1 reduces cancer phenotypes and enhances chemotherapy effectiveness. *Epigenomics* **6**: 267–275

Cherra SJ, 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

Chhabra A, Fernando H, Watkins G, Mansel RE & Jiang WG (2007) Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncol. Rep.* **18**: 953–958

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

Chik F & Szyf M (2011) Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis* **32**: 224–232

Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, Xu J, Abeysundara N, Leung A, Go NE, DeVorkin L, Wepler SA, Gelmon K, Yapp DT, Bally MB & Gorski SM (2014) Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**: 3159–3173

Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**: 532–534, 536–537

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

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL & Wahl GM (2006) Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **66**: 9339–9344

Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, Øvervatn A, Stenmark H, Bjørkøy G, Simonsen A & Johansen T (2010) p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* **6**: 330–344

Corcelle-Termeau E, Vindeløv SD, Hämälistö S, Mograbi B, Keldsbo A, Bräsen JH, Favaro E, Adam D, Szyniarowski P, Hofman P, Krautwald S, Farkas T, Petersen NHT, Rohde M, Linkermann A & Jäättelä M (2016) Excess sphingomyelin disturbs ATG9A trafficking and autophagosome closure. *Autophagy* **12**: 833–849

Cufí S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Vellon L & Menendez JA (2011) Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**: 3871–3885

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

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas 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

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 (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **3**: 295–299

Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI & Tooze SA (2014) WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell* **55**: 238–252

Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, Cuzick J, Houghton J, Williams N, Mallon E, Bishop H, Ellis I, Larsimont D, Sasano H, Carder P, Cussac AL, Knox F, Speirs V, Forbes J & Buzdar A (2008) Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**: 1059–1065

Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, Wang L, Clark RE, Dallol A, Gentle D, Catchpoole D, Maher ER, Pfeifer GP & Latif F (2010) A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Mol. Cancer* **9**: 44

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Clarke M, Coates AS, Darby SC, Davies C, Gelber RD, Godwin J, Goldhirsch A, Gray R, Peto R, Pritchard KI & Wood WC (2008) Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* **371**: 29–40

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J & Peto R (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond.*

Engl. **378**: 771–784

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U & Kimchi A (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* **16**: 966–975

Elston CW & Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**: 403–410

Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutlu GM, Viollet B, Budinger GRS & Chandel NS (2009) Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 1386–1391

Engedal N & Seglen PO (2016) Autophagy of cytoplasmic bulk cargo does not require LC3. *Autophagy* **12**: 439–441

Eskelinen E-L, Tanaka Y & Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13**: 137–145

Fanelli M, Amatori S, Barozzi I & Minucci S (2011) Chromatin immunoprecipitation and high-throughput sequencing from paraffin-embedded pathology tissue. *Nat. Protoc.* **6**: 1905–1919

Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K & De Camilli P (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.* **155**: 193–200

Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F & Piredda L (2008) Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* **4**: 435–441

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D & Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**: E359-386

Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, Bartlett BJ, Myers KM, Birkeland HCG, Lamark T, Krainc D, Brech A, Stenmark H, Simonsen A & Yamamoto A (2010) The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol. Cell* **38**: 265–279

Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K & Cecconi F (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**: 1121–1125

Florey O, Gammoh N, Kim SE, Jiang X & Overholtzer M (2015) V-ATPase and

osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy* **11**: 88–99

Florey O, Kim SE, Sandoval CP, Haynes CM & Overholtzer M (2011) Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* **13**: 1335–1343

Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA & Fingar DC (2010) Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **285**: 80–94

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, et al (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* **37**: 391–400

Francipane MG & Lagasse E (2015) Therapeutic potential of mTOR inhibitors for targeting cancer stem cells. *Br. J. Clin. Pharmacol.*: n/a-n/a

Frankel LB, Wen J, Lees M, Høyer-Hansen M, Farkas T, Krogh A, Jäättelä M & Lund AH (2011) microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J.* **30**: 4628–4641

Frisch SM & Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**: 619–626

Fujioka Y, Noda NN, Nakatogawa H, Ohsumi Y & Inagaki F (2010) Dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J. Biol. Chem.* **285**: 1508–1515

Füllgrabe J, Lynch-Day MA, Heldring N, Li W, Struijk RB, Ma Q, Hermanson O, Rosenfeld MG, Klionsky DJ & Joseph B (2013) The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature* **500**: 468–471

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

Gangemi R, Paleari L, Orengo AM, Cesario A, Chessa L, Ferrini S & Russo P (2009) Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. *Curr. Med. Chem.* **16**: 1688–1703

Ganley IG, Lam DH, 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 X, Zacharek A, Salkowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT & Honn KV (1995) Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 1002–1005

Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B, Yerushalmi R, Macpherson E, Carmichael J & Oza A (2011) Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* **12**: 852–861

Ghayad SE, Bieche I, Vendrell JA, Keime C, Lidereau R, Dumontet C & Cohen PA (2008) mTOR inhibition reverses acquired endocrine therapy resistance of breast cancer cells at the cell proliferation and gene-expression levels. *Cancer Sci.* **99**: 1992–2003

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

Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Deloménie C, Nicolas V, Zhu Y, Domergue V, Marin-Esteban V, Tharinger H, Delbos L, Gary-Gouy H, Morel A-P, 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, 2272–11

Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F & Hortobagyi GN (2007) Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **608**: 1–22

Gottlieb RA & Mentzer RM (2010) Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu. Rev. Physiol.* **72**: 45–59

Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, Hawkins M & O'Shaughnessy J (2005) Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**: 7794–7803

Green F, O'Hare T, Blackwell A & Enns CA (2002) Association of human transferrin receptor with GABARAP. *FEBS Lett.* **518**: 101–106

Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, Blackwell K, Rugo H, Nabell L, Forero A, Stearns V, Doane AS, Danso M, Moynahan ME, Momen LF, Gonzalez JM, Akhtar A, Giri DD, Patil S, Feigin KN, et al (2013) Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**: 5505–5512

Gunja N, Roberts D, McCoubrie D, Lamberth P, Jan A, Simes DC, Hackett P &

Buckley NA (2009) Survival after massive hydroxychloroquine overdose. *Anaesth. Intensive Care* **37**: 130–133

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

Gupta C & Tikoo K (2013) High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *J. Mol. Endocrinol.* **51**: 119–129

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

Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q & Szallasi Z (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**: 725–731

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

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

Harbeck N & Rody A (2012) Lost in translation? Estrogen receptor status and endocrine responsiveness in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**: 686–689

Hartman A-R, Kaldate RR, Sailer LM, Painter L, Grier CE, Endsley RR, Griffin M, Hamilton SA, Frye CA, Silberman MA, Wenstrup RJ & Sandbach JF (2012) Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer* **118**: 2787–2795

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 L & Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 522–531

Heckler MM, Thakor H, Schafer CC & Riggins RB (2014) ERK/MAPK regulates ERR γ expression, transcriptional activity and receptor-mediated tamoxifen resistance in ER+ breast cancer. *FEBS J.* **281**: 2431–2442

Henault J, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, Sasai M, Latz E, Brinkmann MM, Iwasaki A, Coyle AJ, Kolbeck R, Green DR & Sanjuan MA (2012) Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* **37**: 986–997

Hervouet E, Claude-Taupin A, Gauthier T, Perez V, Fraichard A, Adami P, Despouy G, Monnier F, Algros M-P, Jouvenot M, Delage-Mourroux R & Boyer-Guittaut M (2015) The autophagy GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer* **15**: 729

Hollestelle A, Nagel JHA, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, Ng SS, French PJ, Peeters JK, Rozendaal MJ, Riaz M, Koopman DG, Ten Hagen TLM, de Leeuw BHCGM, Zwarthoff EC, Teunisse A, van der Spek PJ, Klijn JGM, Dinjens WNM, Ethier SP, et al (2010) Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **121**: 53–64

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan J-L, Oshiro N & Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**: 1981–1991

Hu X, Sui X, Li L, Huang X, Rong R, Su X, Shi Q, Mo L, Shu X, Kuang Y, Tao Q & He C (2013) Protocadherin 17 acts as a tumour suppressor inducing tumour cell apoptosis and autophagy, and is frequently methylated in gastric and colorectal cancers. *J. Pathol.* **229**: 62–73

Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinauer MC, Magalhaes MAO, Glogauer M, Grinstein S & Brumell JH (2009) Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 6226–6231

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

- Hui R, Finney GL, Carroll JS, Lee CSL, Musgrove EA & Sutherland RL (2002) Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res.* **62**: 6916–6923
- Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM & Kazkaz GA (2014) The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **148**: 467–476
- Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, Hamasaki M, Noda T & Yoshimori T (2016) Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J. Cell Sci.*
- Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee M-S, 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 K-L (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577–590
- Iqbal N & Iqbal N (2014) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol. Biol. Int.* **2014**: 852748
- Itakura E, Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I & Mizushima N (2012a) Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J. Cell Sci.* **125**: 1488–1499
- Itakura E, Kishi-Itakura C & Mizushima N (2012b) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**: 1256–1269
- Itakura E & Mizushima N (2013) Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. *Autophagy* **9**: 917–919
- Itoh T, Fujita N, Kanno E, Yamamoto A, Yoshimori T & Fukuda M (2008) Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* **19**: 2916–2925
- Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T & Mizushima N (2014) The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* **25**: 1327–1337
- Jin M, He D, Backues SK, Freeberg MA, Liu X, Kim JK & Klionsky DJ (2014) Transcriptional regulation by Pho23 modulates the frequency of autophagosome formation. *Curr. Biol. CB* **24**: 1314–1322
- Jones PA & Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics.

Science **293**: 1068–1070

Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, Nguyen YH, Kang TM, Yoon K-H, Kim J-W, Jeong YT, Han MS, Lee M-K, Kim K-W, Shin J & Lee M-S (2008) Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab.* **8**: 318–324

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

Kageyama S, Omori H, Saitoh T, Sone T, Guan J-L, Akira S, Imamoto F, Noda T & Yoshimori T (2011) The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Mol. Biol. Cell* **22**: 2290–2300

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

Kawabata T & Yoshimori T (2016) Beyond starvation: An update on the autophagic machinery and its functions. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **95**: 2–10

Kenific CM, Thorburn A & Debnath J (2010) Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 241–245

Kim EH, Sohn S, Kwon HJ, Kim SU, Kim M-J, Lee S-J & Choi KS (2007) Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* **67**: 6314–6324

Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan K-L (2011a) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**: 132–141

Kim M-J, Woo S-J, Yoon C-H, Lee J-S, An S, Choi Y-H, Hwang S-G, Yoon G & Lee S-J (2011b) Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J. Biol. Chem.* **286**: 12924–12932

Kim R-K, Suh Y, Yoo K-C, Cui Y-H, Kim H, Kim M-J, Gyu Kim I & Lee S-J (2015a) Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. *Exp. Mol. Med.* **47**: e137

Kim Y-M, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park J-M, Bae SS & Kim D-H (2015b) mTORC1

phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol. Cell* **57**: 207–218

Kimura S, Noda T & Yoshimori T (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* **3**: 452–460

Kimura S, Noda T & Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* **33**: 109–122

Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T & Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* **151**: 263–276

Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat J-P, Øvervatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I & Johansen T (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell* **33**: 505–516

Kissová I, Salin B, Schaeffer J, Bhatia S, Manon S & Camougrand N (2007) Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* **3**: 329–336

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E & Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880–884

Komatsu M, Waguri S, 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

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

Kroemer G, Mariño G & Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**: 280–293

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

Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S-I, 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

Kwon JJ, Willy JA, Quirin KA, Wek RC, Korc M, Yin X-M & Kota J (2016) Novel role of miR-29a in pancreatic cancer autophagy and its therapeutic potential. *Oncotarget*

Lai A, Kahraman M, Govek S, Nagasawa J, Bonnefous C, Julien J, Douglas K, Sensintaffar J, Lu N, Lee K-J, Aparicio A, Kaufman J, Qian J, Shao G, Prudente R, Moon MJ, Joseph JD, Darimont B, Brigham D, Grillot K, et al (2015) Identification of GDC-0810 (ARN-810), an Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Degradar (SERD) that Demonstrates Robust Activity in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Xenografts. *J. Med. Chem.* **58**: 4888–4904

Lamb CA, Yoshimori T & Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 759–774

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

Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D, Bredschneider M, Wolf DH & Thumm M (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* **17**: 3597–3607

Laplante M & Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274–293

Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF & Richardson PG (2015) Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **21**: 4767–4773

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC & Semenza GL (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3995–4004

Lazarus MB, Novotny CJ & Shokat KM (2015) Structure of the human autophagy initiating kinase ULK1 in complex with potent inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **10**: 257–261

Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Jouvenot M & Boyer-Guittaut M (2011) GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy* **7**: 1098–1107

Lebovitz CB, Robertson AG, Goya R, Jones SJ, Morin RD, Marra MA & Gorski SM (2015) Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy* **11**: 1668–1687

Lee H-Z, Kwitkowski VE, Valle PLD, Ricci MS, Saber H, Habtemariam BA, Bullock

J, Bloomquist E, Shen YL, Chen X-H, Brown J, Mehrotra N, Dorff S, Charlab R, Kane RC, Kaminskas E, Justice R, Farrell AT & Pazdur R (2015) FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.*: clincanres.3119.2015

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 J-H, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM & Nixon RA (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* **141**: 1146–1158

Lee YJ, Won AJ, Lee J, Jung JH, Yoon S, Lee BM & Kim HS (2012) Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Med. Sci.* **9**: 881–893

Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel A-M, Bourachot B, Zago G, Bieche I, Dubois T, Meseure D, Vincent-Salomon A & Camonis J (2014a) Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy*: 0

Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel A-M, Bourachot B, Zago G, Bieche I, Dubois T, Meseure D, Vincent-Salomon A, Camonis J & Mehta-Grigoriou F (2014b) Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy* **10**: 2122–2142

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y & Pietenpol JA (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**: 2750–2767

Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Dev. Cell* **6**: 463–477

Levine B & Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27–42

Lewis CM, Cler LR, Bu D-W, Zöchbauer-Müller S, Milchgrub S, Naftalis EZ, Leitch AM, Minna JD & Euhus DM (2005) Promoter Hypermethylation in Benign Breast Epithelium in Relation to Predicted Breast Cancer Risk. *Clin. Cancer Res.* **11**: 166–172

Li G, Zhang J, Jin K, He K, Zheng Y, Xu X, Wang H, Wang H, Li Z, Yu X, Teng X, Cao J & Teng L (2013) Estrogen receptor- α 36 is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* **7**: 611–624

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

Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N & Hung M-C (2005) A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res.* **65**: 3257–3263

Li Z, Chen B, Wu Y, Jin F, Xia Y & Liu X (2010) Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer* **10**: 98

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

Liang XH, Yu J, Brown K & Levine B (2001) Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res.* **61**: 3443–3449

Liu C, Xia Y, Jiang W, Liu Y & Yu L (2014a) Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **31**: 2043–2048

Liu Q, Shi X, Zhou X, Wang D, Wang L & Li C (2014b) Effect of autophagy inhibition on cell viability and cell cycle progression in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **10**: 625–630

Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM & Debnath J (2011a) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol. Biol. Cell* **22**: 165–178

Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM & Debnath J (2011b) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol. Biol. Cell* **22**: 165–178

Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura S, Barr FA & Tooze SA (2012) TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **197**: 659–675

Lu Q, Yang P, Huang X, Hu W, Guo B, Wu F, Lin L, Kovács AL, Yu L & Zhang H

(2011) The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Dev. Cell* **21**: 343–357

Lübke T, Lobel P & Sleat DE (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**: 625–635

Luo R-Z, Yuan Z-Y, Li M, Xi S-Y, Fu J & He J (2013) Accumulation of p62 is associated with poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Oncotargets Ther.* **6**: 883–888

Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R & Pazdur R (2007) FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *The Oncologist* **12**: 1247–1252

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 V, Boireau W, Fraichard A, Schlick J-L, 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

Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T & Kelly WK (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 194–202

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 J, Malireddi RKS, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, Orchard R, Guan J-L, Tan H, Peng J, Kanneganti T-D, Virgin HW & Green DR (2015) Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* **17**: 893–906

Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D & Cuervo AM (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* **13**: 567–576

Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V & White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**: 1062–1075

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

Mauthe M, Jacob A, Freiberger S, Hentschel K, Stierhof Y-D, Codogno P & Proikas-Cezanne T (2011) Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy* **7**: 1448–1461

McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA & Chan EYW (2013) Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* **9**: 361–373

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

Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, Yelensky R, Brown M, Miller VA, Sarid D, Rizel S, Klein B, Rubinek T & Wolf I (2013) D538G mutation in estrogen receptor- α : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res.* **73**: 6856–6864

Meric-Bernstam F & Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**: 2278–2287

Millen JJ, Krick R, Prick T, Thumm M & Goldfarb DS (2009) Measuring piecemeal microautophagy of the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **5**: 75–81

Miller TW, Balko JM & Arteaga CL (2011) Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**: 4452–4461

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ & Alatrash G (2014) PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**: 361–370

Mizushima N & Klionsky DJ (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **27**: 19–40

Mizushima N & Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**: 728–741

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

Mo J, Zhang D & Yang R (2016) MicroRNA-195 regulates proliferation, migration, angiogenesis and autophagy of endothelial progenitor cells by targeting GABARAPL1. *Biosci. Rep.* **36**:

Moresi V, Carrer M, Grueter CE, Rifki OF, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R & Olson EN (2012) Histone deacetylases 1 and 2 regulate autophagy flux and skeletal muscle homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 1649–1654

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

Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jaenicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Chaudri-Ross H, Lang R, Wyld P & Bhatnagar A (2003) Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**: 2101–2109

Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Sasaki Y, Akino K, Ueno M, Takahashi F, Kusano M, Mita H, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Tokino T & Imai K (2005) Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**: 1021–1027

Nakamura T, Hayashi T, Nasu-Nishimura Y, Sakaue F, Morishita Y, Okabe T, Ohwada S, Matsuura K & Akiyama T (2008) PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/beta-catenin complex. *Genes Dev.* **22**: 1244–1256

Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Pusztai L, Dolled-Filhart M, Emancipator K, Gonzalez EJ, Houp J, Pathiraja K, Karantza V, Iannone R, Gause CK, Cheng JD & Buisseret L (2015) Abstract S1-09: A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **75**: S1-9-S1-9

Negri T, Tarantino E, Orsenigo M, Reid JF, Gariboldi M, Zambetti M, Pierotti MA & Pilotti S (2010) Chromosome band 17q21 in breast cancer: significant association between beclin 1 loss and HER2/NEU amplification. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**: 901–909

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

Nervi C, De Marinis E & Codacci-Pisanelli G (2015) Epigenetic treatment of solid tumours: a review of clinical trials. *Clin. Epigenetics* **7**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4676165/> [Accessed October 24, 2016]

Nezich CL, Wang C, Fogel AI & Youle RJ (2015) MiT/TFE transcription factors are activated during mitophagy downstream of Parkin and Atg5. *J. Cell Biol.* **210**: 435–450

Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM & Bhargava R (2010) Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23**: 205–212

Noda T, Kim J, Huang W-P, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y & Klionsky DJ (2000) Apg9p/Cvt7p Is an Integral Membrane Protein Required for Transport Vesicle Formation in the Cvt and Autophagy Pathways. *J. Cell Biol.* **148**: 465–480

Nunes J, Zhang H, Angelopoulos N, Chhetri J, Osipo C, Grothey A, Stebbing J & Giamas G (2016) ATG9A loss confers resistance to trastuzumab via c-Cbl mediated Her2 degradation. *Oncotarget* **7**: 27599–27612

Okamoto K (2014) Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.* **205**: 435–445

Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, Hirata T, Yonemori K, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita T, Takiguchi Y, Tanzawa H & Fujiwara Y (2012) Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**: 793–805

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

Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Tallóczy Z, Zou Z & Levine B (2010) Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* **7**: 115–127

Pacaud R, Brocard E, Lalier L, Hervouet E, Vallette FM & Cartron P-F (2014) The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Sci. Rep.* **4**: 4230

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D & Yahalom J (2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* **61**: 439–444

Palorini R, Votta G, Pirola Y, De Vitto H, De Palma S, Airoidi C, Vasso M, Ricciardiello F, Lombardi PP, Cirulli C, Rizzi R, Nicotra F, Hiller K, Gelfi C, Alberghina L & Chiaradonna F (2016) Protein Kinase A Activation Promotes Cancer Cell Resistance to Glucose Starvation and Anoikis. *PLoS Genet.* **12**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4792400/> [Accessed October 25, 2016]

Pankiv S, Alemu EA, Brech A, Bruun J-A, Lamark T, Overvatn A, Bjørkøy G & Johansen T (2010) FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* **188**: 253–269

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy 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

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

Peixoto P, Castronovo V, Matheus N, Polese C, Peulen O, Gonzalez A, Boxus M, Verdin E, Thiry M, Dequiedt F & Mottet D (2012) HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells. *Cell Death Differ.* **19**: 1239–1252

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 Y-F, Shi Y-H, Ding Z-B, Ke A-W, Gu C-Y, Hui B, Zhou J, Qiu S-J, 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 EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, Martino S, Rastogi P, Gralow J, Swain SM, Winer EP, Colon-Otero G, Davidson NE, Mamounas E, Zujewski JA & Wolmark N (2014) Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J. Clin. Oncol.* **32**: 3744–3752

Pinilla SMR, Honrado E, Hardisson D, Benítez J & Palacios J (2006) Caveolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **99**: 85–90

Polson HEJ, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ & Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and

positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**: 506–522

Popovic D & Dikic I (2014) TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep.* **15**: 392–401

Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, Frickey T, Lupas A & Nordheim A (2004) WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* **23**: 9314–9325

Puente C, Hendrickson RC & Jiang X (2016) Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J. Biol. Chem.* **291**: 6026–6035

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

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E-L, 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

Reggiori F, Shintani T, Nair U & Klionsky DJ (2005) Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* **1**: 101–109

Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE & Klionsky DJ (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell* **6**: 79–90

Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, Scherer SW, Nakabayashi K & Marsden PA (2004) Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by an Overlapping Antisense mRNA Transcript. *J. Biol. Chem.* **279**: 37982–37996

Robert M-F, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A & MacLeod AR (2003) DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.* **33**: 61–65

Robert T, Vanoli F, Chiolo I, Shubassi G, Bernstein KA, Rothstein R, Botrugno OA, Parazzoli D, Oldani A, Minucci S & Foiani M (2011) HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* **471**: 74–79

Robinson DR, Wu Y-M, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Wang R, Ning Y, Hodges L, Gursky A, Siddiqui J, Tomlins SA, Roychowdhury S, Pienta KJ, Kim SY, Roberts JS, Rae JM, Van Poznak CH, Hayes DF, et al (2013) Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat. Genet.* **45**: 1446–1451

- Roczniak-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC & Ferguson SM (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci. Signal.* **5**: ra42
- Rolland P, Madjd Z, Durrant L, Ellis IO, Layfield R & Spendlove I (2007) The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr. Relat. Cancer* **14**: 73–80
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A & Guan K-L (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* **15**: 741–750
- Sadakierska-Chudy A & Filip M (2015) A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotox. Res.* **27**: 172–197
- Saftig P & Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 623–635
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A & Elazar Z (2000) GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J.* **19**: 1494–1504
- Saito H, Inazawa J, Saito S, Kasumi F, Koi S, Sagae S, Kudo R, Saito J, Noda K & Nakamura Y (1993) Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Res.* **53**: 3382–3385
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T & Akira S (2009) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 20842–20846
- Salvador N, Aguado C, Horst M & Knecht E (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* **275**: 27447–27456
- 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, 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

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

Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ & Rubinsztein DC (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* **170**: 1101–1111

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

Schindler M, Grabski S, Hoff E & Simon SM (1996) Defective pH Regulation of Acidic Compartments in Human Breast Cancer Cells (MCF-7) Is Normalized in Adriamycin-Resistant Cells (MCF-7adr). *Biochemistry (Mosc.)* **35**: 2811–2817

Schleicher SM, Moretti L, Varki V & Lu B (2010) Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **13**: 79–86

Schoenlein PV, Periyasamy-Thandavan S, Samaddar JS, Jackson WH & Barrett JT (2009) Autophagy facilitates the progression of ERalpha-positive breast cancer cells to antiestrogen resistance. *Autophagy* **5**: 400–403

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

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

Sekito T, Kawamata T, Ichikawa R, Suzuki K & Ohsumi Y (2009) Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **14**: 525–538

Seok S, Fu T, Choi S-E, Li Y, Zhu R, Kumar S, Sun X, Yoon G, Kang Y, Zhong W, Ma J, Kemper B & Kemper JK (2014) Transcriptional regulation of autophagy by an FXR/CREB axis. *Nature* **516**: 108–111

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, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, 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

Shanbhogue A, Shah SN, Zaheer A, Prasad SR, Takahashi N & Vikram R (2011) Hepatocellular adenomas: current update on genetics, taxonomy, and management. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **35**: 159–166

Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M & Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**: 908–912

Sharma D, Blum J, Yang X, Beaulieu N, Macleod AR & Davidson NE (2005) Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **19**: 1740–1751

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

Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S & Elazar Z (2011) Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.* **12**: 226

Shukla S, Patric IRP, Patil V, Shwetha SD, Hegde AS, Chandramouli BA, Arivazhagan A, Santosh V & Somasundaram K (2014) Methylation silencing of ULK2, an autophagy gene, is essential for astrocyte transformation and tumor growth. *J. Biol. Chem.* **289**: 22306–22318

Siegel RL, Miller KD & Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**: 7–30

Skalnik DG (2010) The epigenetic regulator Cfp1. *Biomol. Concepts* **1**: 325–334

Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C & Harris AL (2003) Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *J. Pathol.* **201**: 573–580

Staudt C, Gilis F, Tevel V, Jadot M & Boonen M (2016) A conserved glycine residue in the C-terminal region of human ATG9A is required for its transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Stendahl M, Kronblad A, Rydén L, Emdin S, Bengtsson NO & Landberg G (2004) Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **90**: 1942–1948

Sun Q, Westphal W, Wong KN, Tan I & Zhong Q (2010) Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 19338–19343

Sun Q, Zhang J, Fan W, Wong KN, Ding X, Chen S & Zhong Q (2011) The RUN domain of rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression. *J. Biol. Chem.* **286**: 185–191

Sun T, Li X, Zhang P, Chen W-D, Zhang H, Li D-D, Deng R, Qian X-J, Jiao L, Ji J, Li Y-T, Wu R-Y, Yu Y, Feng G-K & Zhu X-F (2015) Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nat. Commun.* **6**: 7215

Suzuki K, Kubota Y, Sekito T & Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **12**: 209–218

Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, Loughran TP & Wang H-G (2011) Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* **7**: 61–73

Takahashi Y, Tsotakos N, Liu Y, Young MM, Serfass J, Tang Z, Abraham T & Wang H-G (2016) The Bif-1-Dynamin 2 membrane fission machinery regulates Atg9-containing vesicle generation at the Rab11-positive reservoirs. *Oncotarget* **7**: 20855–20868

Takai D & Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 3740–3745

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

Tan EY, Campo L, Han C, Turley H, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL & Fox SB (2007) BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer; opposing functions in in situ versus invasive cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**: 467–474

Tan X, Thapa N, Sun Y & Anderson RA (2015) A kinase-independent role for EGF receptor in autophagy initiation. *Cell* **160**: 145–160

Tang H, Sebti S, Titone R, Zhou Y, Isidoro C, Ross TS, Hibshoosh H, Xiao G, Packer M, Xie Y & Levine B (2015) Decreased BECN1 mRNA Expression in Human Breast Cancer is Associated with Estrogen Receptor-Negative Subtypes and Poor Prognosis. *EBioMedicine* **2**: 255–263

Tang H-W, Wang Y-B, Wang S-L, Wu M-H, Lin S-Y & Chen G-C (2011) Atg1-

mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *EMBO J.* **30**: 636–651

Tang J-Y, Hsi E, Huang Y-C, Hsu NC-H, Chen Y-K, Chu P-Y & Chai C-Y (2013) ATG9A overexpression is associated with disease recurrence and poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **463**: 737–742

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

Thompson HGR, Harris JW, Wold BJ, Lin F & Brody JP (2003) p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* **22**: 2322–2333

Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N & Randow F (2009) The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* **10**: 1215–1221

Trousdale C & Kim K (2015) Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur. J. Cell Biol.* **94**: 513–521

Tsukada M & Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**: 169–174

Vakkila J & Lotze MT (2004) Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 641–648

VanderMolen KM, McCulloch W, Pearce CJ & Oberlies NH (2011) Romidepsin (Istodax®, NSC 630176, FR901228, FK228, Depsipeptide): A Natural Product Recently Approved for Cutaneous T-cell Lymphoma. *J. Antibiot. (Tokyo)* **64**: 525–531

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C & Menendez JA (2009) Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PloS One* **4**: e6251

Venza M, Visalli M, Catalano T, Biondo C, Beninati C, Teti D & Venza I (2016) DNA methylation-induced E-cadherin silencing is correlated with the clinicopathological features of melanoma. *Oncol. Rep.* **35**: 2451–2460

Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, Dulieu P, Rémy-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

Walker AJ, Wedam S, Amiri-Kordestani L, Bloomquist E, Tang S, Sridhara R, Chen W, Palmby TR, Fourie Zirkelbach J, Fu W, Liu Q, Tilley A, Kim G, Kluetz PG, McKee AE & Pazdur R (2016) FDA Approval of Palbociclib in Combination with Fulvestrant for the Treatment of Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Wang CW, Kim J, Huang WP, Abeliovich H, Stromhaug PE, Dunn WA & Klionsky DJ (2001) Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J. Biol. Chem.* **276**: 30442–30451

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 X, Qi W, Li Y, Zhang N, Dong L, Sun M, Cun J, Zhang Y, Lv S & Yang Q (2015) Huaier Extract Induces Autophagic Cell Death by Inhibiting the mTOR/S6K Pathway in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* **10**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489895/> [Accessed September 13, 2016]

Wang Y & Leung FCC (2004) An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **20**: 1170–1177

Wang Z, Wang N, Liu P, Chen Q, Situ H, Xie T, Zhang J, Peng C, Lin Y & Chen J (2014) MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquiritigenin. *Oncotarget* **5**: 7013–7026

Webber JL & Tooze SA (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38 α MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* **29**: 27–40

Weerasekara VK, Panek DJ, Broadbent DG, Mortenson JB, Mathis AD, Logan GN, Prince JT, Thomson DM, Thompson JW & Andersen JL (2014) Metabolic-stress-induced rearrangement of the 14-3-3 ζ interactome promotes autophagy via a ULK1- and AMPK-regulated 14-3-3 ζ interaction with phosphorylated Atg9. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 4379–4388

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

Wen J, Yeo S, Wang C, Chen S, Sun S, Haas MA, Tu W, Jin F & Guan J-L (2015) Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Breast Cancer Res. Treat.*

149: 619–629

Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, Clark GM & McGuire WL (1993) DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **28:** 9–20

Whelan KA, Schwab LP, Karakashev SV, Franchetti L, Johannes GJ, Seagroves TN & Reginato MJ (2013) The Oncogene HER2/neu (ERBB2) Requires the Hypoxia-inducible Factor HIF-1 for Mammary Tumor Growth and Anoikis Resistance. *J. Biol. Chem.* **288:** 15865–15877

White E & DiPaola RS (2009) The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15:** 5308–5316

Wild P, McEwan DG & Dikic I (2014) The LC3 interactome at a glance. *J. Cell Sci.* **127:** 3–9

Wilkinson DS, Jariwala JS, Anderson E, Mitra K, Meisenhelder J, Chang JT, Ideker T, Hunter T, Nizet V, Dillin A & Hansen M (2015) Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Mol. Cell* **57:** 55–68

Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, Jahreiss L, Fleming A, Pask D, Goldsmith P, O’Kane CJ, Floto RA & Rubinsztein DC (2008) Novel targets for Huntington’s disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* **4:** 295–305

Winslow AR, Chen C-W, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O’Kane CJ & Rubinsztein DC (2010) α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson’s disease. *J. Cell Biol.* **190:** 1023–1037

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, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, 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. CB* **13:** 2004–2008

Wu T, Li Y, Gong L, Lu J-G, Du X-L, Zhang W-D, He X-L & Wang J-Q (2012) Multi-step process of human breast carcinogenesis: a role for BRCA1, BECN1, CCND1, PTEN and UVRAG. *Mol. Med. Rep.* **5:** 305–312

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

Yadav BS, Sharma SC, Chanana P & Jhamb S (2014) Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**: 125–133

Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umebayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K & Scherer SW (2005) Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J. Biol. Chem.* **280**: 18283–18290

Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R & Tashiro Y (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* **23**: 33–42

Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, Ichikawa R, Kinjo M & Ohsumi Y (2012) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* **198**: 219–233

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

Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl 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 ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM & Narita M (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* **23**: 798–803

Yue W, Hamai A, Tonelli G, Bauvy C, Nicolas V, Tharinger H, Codogno P & Mehrpour M (2013) Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance. *Autophagy* **9**: 714–729

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

Zavodszky E, Seaman MNJ, Moreau K, Jimenez-Sanchez M, Breusegem SY, Harbour ME & Rubinsztein DC (2014) Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease

impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat. Commun.* **5**: 3828

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 H, Kong X, Kang J, Su J, Li Y, Zhong J & Sun L (2009) Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **110**: 376–388

Zhang X, Li C, Wang D, Chen Q, Li C-L & Li H-J (2016) Aberrant methylation of ATG2B, ATG4D, ATG9A and ATG9B CpG island promoter is associated with decreased mRNA expression in sporadic breast carcinoma. *Gene* **590**: 285–292

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/ β -catenin signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **27**: 503–512

Zhao H, Yu Z, Zhao L, He M, Ren J, Wu H, Chen Q, Yao W & Wei M (2016) HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy. *Jpn. J. Clin. Oncol.* Available at: <http://jjco.oxfordjournals.org/content/early/2016/07/18/jjco.hyw096> [Accessed September 15, 2016]

Zhao T, Huang X, Han L, Wang X, Cheng H, Zhao Y, Chen Q, Chen J, Cheng H, Xiao R & Zheng M (2012) Central role of mitofusin 2 in autophagosome-lysosome fusion in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **287**: 23615–23625

Zhao Y, Yang J, Liao W, Liu X, Zhang H, Wang S, Wang D, Feng J, Yu L & Zhu W-G (2010) Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nat. Cell Biol.* **12**: 665–675

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

Zhu H, Wu H, Liu X, Li B, Chen Y, Ren X, Liu C-G & Yang J-M (2009) Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* **5**: 816–823

Zmijewski JW, Banerjee S, Bae H, Friggeri A, Lazarowski ER & Abraham E (2010) Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **285**: 33154–33164

Zoppino FCM, Militello RD, Slavin I, Alvarez C & Colombo MI (2010)

Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites. *Traffic Cph. Den.* **11**: 1246–1261

Zou C-F, Jia L, Jin H, Yao M, Zhao N, Huan J, Lu Z, Bast RC, Feng Y & Yu Y (2011) Re-expression of ARHI (DIRAS3) induces autophagy in breast cancer cells and enhances the inhibitory effect of paclitaxel. *BMC Cancer* **11**: 22

Etude du rôle de la protéine autophagique ATG9A dans les cancers du sein.

L'autophagie est un mécanisme cellulaire complexe, nécessitant plus de 40 protéines ATGs (AuTophagy related), impliqué dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Sa dérégulation a été décrite comme une cause possible de la tumorigénèse. Nos travaux ont montré dans une cohorte de 80 patientes atteintes de cancer du sein, que l'expression du gène codant la protéine ATG9A, jouant un rôle dans les étapes précoces de l'autophagie, est plus importante dans les tissus cancéreux des patientes de type triple négatif. Afin d'étudier le rôle d'ATG9A dans la lignée de cancer du sein triple négative MDA-MB-436, nous avons développé deux modèles d'extinction du gène *ATG9A* à l'aide de sh-ARN ou de la technique CRISPR-Cas9. Ces modèles d'extinction présentent un blocage de l'autophagie *via* une diminution de la dégradation des autophagosomes. Nous avons également montré une inhibition des phénotypes cancéreux *in vitro* et *in vivo* des cellules sh-*ATG9A* comparé aux cellules contrôles. Cependant, nous n'avons observé aucune différence de phénotypes cancéreux entre le modèle CRISPR-Cas9 et les cellules contrôles. L'ARNm d'*ATG9A* étant toujours détecté dans notre modèle CRISPR-Cas9, contrairement au modèle sh-RNA, nous avons émis l'hypothèse que l'ARNm d'*ATG9A* pourrait jouer un rôle dans la maintenance des phénotypes cancéreux *via* l'expression d'une isoforme de la protéine ATG9A, exprimée après mutation de la séquence d'*ATG9A* par le système CRISPR-Cas9 ou *via* son interaction avec des ARN non codants régulateurs. Si cette hypothèse est confirmée, cet ARNm pourrait devenir une cible thérapeutique dans les cancers du sein triple négatif pour lesquels aucune thérapie ciblée n'existe actuellement.

Study of the role of ATG9A, an autophagic protein, in breast cancer.

Autophagy is an intracellular process which contributes to the maintenance of cell homeostasis. The deregulation of this complex process, which requires more than 40 ATG proteins, has been shown to be involved in tumor development. In our laboratory, we analyzed a cohort of 80 breast cancers and demonstrated that *ATG9A* gene expression is increased in triple negative breast cancer samples compared to adjacent healthy tissues. We then studied the role of ATG9A in the triple negative breast cancer cell line MDA-MB-436 using two extinction models created with the sh-RNA or the CRISPR-Cas9 technology. Our two extinction models presented a blockade of autophagy, due to a decrease of autophagosome degradation. We also observed a decrease of *in vitro* and *in vivo* cancer phenotypes, such as proliferation, invasion or *in vivo* tumor growth, of sh-ATG9A cells compared to control cells. However, we did not observe any difference of cancer phenotypes between the CRISPR-Cas9 cells and the control ones. Since we still detected the presence of the *ATG9A* mRNA in the CRISPR models but not in the sh-RNA models, we hypothesized that this mRNA might play a role in the maintenance of breast cancer phenotypes in these cells, either by the expression of a truncated isoform of the ATG9A protein from the mutated *ATG9A* mRNA obtained after the action of the CRISPR-Cas9 system, or its interaction with non-coding mRNAs. If proven, this could establish *ATG9A* mRNA as a potential therapeutic target in triple negative breast cancers for which no targeted therapy is currently available.