



HAL
open science

Rôle de l'autophagie lors de la Transition Epithélio Mésenchymateuse des cellules cancéreuses

Marine Jacquet

► **To cite this version:**

Marine Jacquet. Rôle de l'autophagie lors de la Transition Epithélio Mésenchymateuse des cellules cancéreuses. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCE001 . tel-03379725

HAL Id: tel-03379725

<https://theses.hal.science/tel-03379725>

Submitted on 15 Oct 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'UFR SCIENCES ET TECHNIQUES DE BESANÇON

Ecole doctorale n°554
Ecole doctorale Environnements Santé

Doctorat de Biochimie et biologie moléculaire

Par
Melle Jacquet Marine

Rôle de l'autophagie lors de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules cancéreuses

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 5 mars 2020

Composition du Jury :

Pr. Esclatine Audrey	Professeur des Universités, I2BC, CEA, CNRS	Présidente
Dr. Legouis Renaud	Directeur de recherche, CNRS, I2BC	Rapporteur
Pr. Valcourt Ulrich	Professeur des Universités, UMR5305, CNRS, Univ Lyon 1, LBTI	Rapporteur
Pr. Esclatine Audrey	Professeur des Universités, I2BC, CEA, CNRS	Examinatrice
Dr. Lapaquette Pierre	Maître de conférence, UMR PAM	Examineur
Dr. Despouy Gilles	Maître de conférence, UMR1098, TIM-C, AETIC	Directeur de thèse
Dr. Fraichard Annick	Maître de conférence, UMR1098, TIM-C, AETIC	Codirectrice de thèse

SOMMAIRE

Table des matières

SOMMAIRE	3
ABBREVIATIONS ET ACRONYMES	11
CADRE ET BUT DU TRAVAIL	17
INTRODUCTION	21
I. AUTOPHAGIE	23
1. QU'EST-CE QUE L'AUTOPHAGIE ?	23
2. MECANISME MOLECULAIRE DE L'AUTOPHAGIE	23
2.1. Induction/initiation (Figure 2, ①)	26
2.1.1 Le complexe ULK1	26
2.1.2 Le complexe PI3KC3-C1	28
2.2. Elongation et maturation du phagophore (Figure 2, ②)	28
2.2.1 Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1	29
2.2.2 Le système de conjugaison ATG8	29
2.3. Relocalisation des autophagosomes (Figure 2, ③)	33
2.3.1 Les microtubules	33
2.3.2 Les moteurs moléculaires	33
2.3.3 Rôles des protéines ATG8	33
2.4. Fusion autophagosome/lysosome (Figure 2, ④)	35
2.4.1 Les protéines SNARE	35
2.4.2 Implication des protéines ATG8	35
3. AUTOPHAGIE SELECTIVE	36
3.1. Généralités	36
3.2. Rôles des protéines ATG8 dans l'autophagie sélective	37
4. AUTOPHAGIE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES	38
4.1. Développement et maintien des caractéristiques de cellules souches	39
4.2. Autophagie et réponse aux stress cellulaires	39
4.2.1 ERO et hypoxie	39
4.2.2 Réponse aux stress du RE	40
4.2.3 Carence en nutriments	41

4.3. Autophagie et pathologies _____	42
II. AUTOPHAGIE ET CANCER _____	43
1. GENES DE L'AUTOPHAGIE ET CANCER _____	43
1.1. Diminution de l'expression des gènes de l'autophagie _____	43
1.2. Surexpression des gènes de l'autophagie _____	44
2. ROLES DE L'AUTOPHAGIE DANS LA PROGRESSION TUMORALE _____	45
2.1. Rôle anti-tumoral de l'autophagie _____	45
2.1.1 Autophagie, oncogènes et transformation cellulaire _____	45
2.1.2 Autophagie et morts cellulaires _____	47
2.2. Rôle pro-tumoral de l'autophagie _____	48
2.2.1 Autophagie, carence nutritive et hypoxie _____	48
2.2.2 L'autophagie permet la survie des cellules en dormance _____	49
2.2.3 L'autophagie inhibe l'apoptose _____	49
2.2.4 Autophagie et maintien des propriétés de cellules souches _____	49
2.2.5 Autophagie et stroma tumoral _____	50
2.3. Autophagie et thérapies antitumorales _____	51
2.3.1 Inhiber l'autophagie pour inhiber son rôle cytoprotecteur _____	51
2.3.2 Activer l'autophagie pour activer la mort par autophagie _____	52
3. ATG8 ET CANCER _____	52
3.1. Les protéines ATG8 _____	52
3.1.1 La sous-famille GABARAP _____	53
3.1.2 La sous-famille LC3 _____	54
3.2. Implication des protéines ATG8 dans le cancer _____	55
3.2.1 Les protéines ATG8, fonction suppresseur de tumeur et marqueurs de bon pronostic _____	56
3.2.2 Les protéines ATG8, oncogènes cellulaires et marqueurs de mauvais pronostic _____	58
III. TEM –AUTOPHAGIE _____	59
1. TEM & CANCER _____	59
1.1. Découverte de l'implication de la TEM dans la carcinogénèse _____	60
1.2. TEM et formation des métastases _____	61
1.3. TEM et échappement du système immunitaire _____	63
1.4. TEM, CSC et résistance aux thérapies _____	63
2. LES VOIES D'INDUCTION DE LA TEM _____	64
2.1. La voie classique du TGFβ ₁ _____	64
2.1.1 Le TGFβ ₁ et ses récepteurs _____	65
2.1.2 La voie canonique SMAD dépendante du TGFβ _____	66

2.1.3	Les voies non SMAD dépendantes du TGFβ	68
2.1.4	Régulation de la voie du TGFβ	69
2.2.	Autres voies d'induction de la TEM	69
3.	LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION CLEFS DE LA TEM	70
3.1.	Les facteurs de transcription SNAI1	71
3.1.1	La régulation transcriptionnelle de SNAI1	71
3.1.2	La régulation par des modifications post-traductionnelles de SNAI1	71
3.2.	Les facteurs de transcription TWIST	73
3.2.1	Au niveau transcriptionnel	74
3.2.2	Au niveau post-traductionnel	74
3.3.	Les facteurs de transcription ZEB	74
3.3.1	Au niveau transcriptionnel	75
3.3.2	Au niveau post traductionnel	75
4.	LES GENES CIBLES DES EMT-TF	75
4.1.	Répression du phénotype épithélial : E-Cadhérine	75
4.1.1	Mécanisme de répression de CDH1 au cours de la TEM	76
4.1.2	E-Cadhérine et voies de signalisation	77
4.2.	Activation du phénotype mésenchymateux	78
4.2.1	Mécanisme de régulation de la N-Cadhérine au cours de la TEM	78
4.2.2	N-Cadhérine et voies de signalisation	78
5.	TEM ET AUTOPHAGIE	79
5.1.	Stimuli, acteurs et voies de signalisation communs de la TEM et de l'autophagie	80
5.2.	L'autophagie inhibe la TEM	81
5.3.	L'autophagie est nécessaire à la TEM	82
5.4.	La TEM et protéines ATG8	84

MATERIELS ET METHODES 85

I.	CULTURE CELLULAIRE	87
1.	LIGNEES CELLULAIRES UTILISEES	87
1.1.	Modèles cellulaires de surexpression de GABARAPL1	87
1.1.1	MCF-7C, Flag-GABARAPL1-6His, Flag GABARAPL1-G116A-6His c1 et c2	87
1.1.2	BT474	87
1.2.	Modèles cellulaires d'inactivation de GABARAPL1	88
1.2.1	La technologie CRISPR/Cas9	88

1.2.2	A549, A549 KO GABARAPL1 c1 et c3	88
1.2.3	ACHN et ACHN KO GABARAPL1 cA et cB	89
1.2.4	Séquençage des mutations introduites par CRISPR/Cas9	90
1.3.	A549c luc, KO GABARAPL1 c1 luc et c3 luc	90
1.4.	A549 DKO I GABARAPL1/GABARAP (DKO GL1/GBP) et ACHN DKO GABARAPL1/GABARAP A et B (DKO GL1/GBP A et B)	91
2.	ENTRETIEN DES CELLULES	91
3.	CONGELATION ET DECONGELATION	91
4.	TRANSFECTION CELLULAIRE	92
4.1.	Transfection réactif Jetprime	92
4.2.	Transfection réactif mirus Transit [®] -2020	92
5.	TRI CELLULAIRE	93
6.	TRAITEMENTS CHIMIQUES DES CELLULES	93
6.1.	Etude de l'autophagie	93
6.1.1	Etude de la protéine LC3B par Western blotting	94
6.1.2	Etude des vésicules autophagiques par transfection pGFP-RFP-LC3	94
6.2.	Etude de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse	94
6.3.	Autres traitements utilisés	94
II.	ANALYSE DES PROTEINES	94
1.	EXTRACTION DES PROTEINES	94
2.	WESTERN BLOT	95
3.	ETUDE DES CELLULES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	96
3.1.	Immunofluorescence	96
3.2.	Transfection transitoire de protéines fluorescentes	97
3.3.	Marquage des cellules à la phalloïdine	97
III.	ANALYSE DES ARN TOTAUX	97
1.	EXTRACTION DES ARN TOTAUX	97
2.	REVERSE TRANSCRIPTION	98
3.	ANALYSE PAR PCR EN TEMPS REEL	98
IV.	ETUDE DES PHENOTYPES CANCEREUX <i>IN VITRO</i>	99
1.	TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE : TEST MTT	99
2.	TEST DE MIGRATION ET D'INVASION EN CHAMBRE DE BOYDEN	99
2.1.	Migration cellulaire	99
2.2.	Invasion cellulaire	100
V.	ETUDE DE LA FORMATION DES METASTASES <i>IN VIVO</i>	100

VI. CLONAGE PLASMIDIQUE	100
1. PCR ADN POLYMÉRISE PHUSION HIGH-FIDELITY	101
2. CLONAGE DANS UN VECTEUR PJET	101
3. TRANSFORMATION ET CULTURE BACTERIENNE	101
RESULTATS	103
I. ETUDE DU ROLE DE GABARAPL1 DANS LA CARCINOGENESE	105
	113
II. ETUDE DU ROLE DE GABARAPL1 DANS LA FORMATION DES METASTASES	207
III. ETUDE DU ROLE DE LA DOUBLE INVALIDATION GABARAPL1/GABARAP DANS LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE DES CELLULES CANCEREUSES	208
1. OBTENTION DES MODELES CELLULAIRES	209
2. IMPACT DE LA DOUBLE INVALIDATION GABARAPL1/GABARAP SUR L'AUTOPHAGIE	209
3. IMPACT DE LA DOUBLE INVALIDATION GABARAPL1/GABARAP SUR LA TEM	211
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	215
I. PROTEINES ATG8 ET AUTOPHAGIE	217
II. ATG8, CANCER ET TEM	224
III. PERSPECTIVES A LONG TERME	234
BIBLIOGRAPHIE	237
ANNEXES	269

ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

3-MA	3-Méthyladénine	EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ADN	acide désoxyribonucléique	EGF	épithélial growth factor
AIM	ATG8 interacting motif	eIF2α	eukaryotic initiation factor-2 \square
AMP	Adénosine monophosphate	EMT-TF	EMT-related transcription factors
AMPK	adénosine monophosphate associated protein kinase	ER+	estrogen receptor positive
		ERK	extracellular signal-regulated kinase
ARN	acide ribonucléique		
AT1	angiotensin receptor type 1	ERO	espèces réactives de l'oxygène
ATF	activating transcription factor	FKBP8	FK506 binding protein 8
ATG	autophagy related	FBXL-14	F-Box and Leucine Rich Repeat Protein 14
ATP	adénosine triphosphate	FGFR	fibroblast growth factor receptor
β-Trcp	β -transducin repeats-containing protein	FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa
Bcl-2	B cell lymphomas 2		
bHLH	basic helix loop helix	Fn14	fibroblast growth factor-inducible 14
BNIP3	Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3	FoxO	forkhead box transcription factors of the O class
BRUCE	BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme		
BSA	bovin serum albumin	FUNDC1	FUN14-domain containing protein 1
CAF	cancer-associated fibroblastes	FYCO	FYVE and coiled-coil domain-containing protein
Cas9	caspace 9	GABA_A	γ -aminobutyric acid type A
Cdc42	cell division control protein 42 homolog	GABARAP	GABA _A receptor-associated protein
CDH	cadherin	GABARAPL1	GABARAP like 1
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	GABARAPL2	GABARAP like 2
CHOP	C/EBP homologous protein	GAPDH	glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
CK2	casein kinase 2	GATA3	GATA binding protein 3
CMA	chaperone-mediated autophagy	GATE16	golgi associated ATPase enhancer of 16 kDa
Co-SMAD	common mediator SMAD		
CRC	colorectal cancer cells	GEC1	glandular epithelial cells 1
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	GFP	green fluorescent protein
CRM1	chromosomal maintenance 1	GIM	GABARAP interacting motif
CSC	cancer stem cells	GRASP55	golgi reassembly-stacking protein of 55 kDa
CTL	lymphocyte T cytotoxique	GSK-3β	glycogen synthase kinase 3 \square
CXCL-12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	HCQ	hydroxychloroquine
DEDD	death-effector domain-containing DNA-binding protein	HDAC	histone deacetylase
DMSO	diméthyl sulfoxyde	HGF	hepatocyte growth factor
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate	HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1 \square
Dvl2	dishvelled 2		

HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
Hsc-70	heat shock cognate 70	P/CAF	P300/CBP-associated factor
I-SMAD	Inhibitors SMAD	PAK1	P21 (RAC1) Activated Kinase 1
IGF	insulin-like growth factor	Parkin	parkinsonian protein
IL	interleukine	pb	paires de bases
IRE1	inositol requiring enzyme 1	PBS	phosphate buffered saline
IRGM	immunity related GTPase	PCR	Polymerase chain reaction
JAK	janus kinase	PDK1	Protein kinase D1
JIP1	JNK-interacting protein group 1	PE/PS	phosphatidylethanolamine / phosphatidylsérine
JNK	jun n-terminal kinase	PERK	PKR-like eIF2 γ kinase
LAMP2A	lysosomal-associated membrane protein 2A	PFA	Paraformaldéhyde
LAP	LC3-associated phagocytosis	pH	Potentiel d'hydrogène
LC3	light chain 3	PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
LDR	low-density lipoprotein receptor-related protein	PI3KC3	phosphatidylinositol 3 kinase de classe III
LEF	lymphocyte enhancer factor	PI3KC3-C1	phosphatidylinositol 3 kinase de classe III complex 1
LIR	LC3-interacting motif	PI3P	phosphatidylinositol-3 phosphate
LMC	leucémie myéloïde chronique	PI4KIIα	phosphatidylinositol 4-kinase II α
LOXL	lysyl oxidase-like	PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
MAP	microtubule-associated protein	PKA/B	protein kinase A/B
MAPK	mitogen-activated protein kinase	PLEKHM1	pleckstrin homology domain containing protein family member 1
MCF-7	michigan cancer foundation-7	POU5F1	POU Class 5 Homeobox 1
MDA-MB-436	M.D Anderson-metastatic breast-436	PRAS40	proline-rich Akt substrate 40kDa, substrat d'Akt de 40 kDa, riche en proline
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8	R-SMAD	receptor associated SMAD
MMP	matrix metalloproteinase	Rac	Rac Family Small GTPase 1
MSCs	mesenchymal stem cells	Raf	Raf-1 Proto-Oncogene, serine/threonine kinase
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinases	Rag	regulator protein
MTOR	mammalian target of rapamycin	Raptor	regulatory associated protein of mTOR
MTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1	RE	réticulum endoplasmique
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium	Rheb	Ras homolog enriched in brain
NBR1	neighbour of BRCA1	RhoA	Ras Homolog Family Member A
NDP52	nuclear dot protein of 52 kDa	RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
NES	nuclear export sequence	RTK	récepteur tyrosine kinase
NF-κB	nuclear factor kappa B	SA-β-Gal	senescence-associated β -galactosidase
NIX	nip-like protein X		
NK	natural killer		
NLS	nuclear localization-like sequence		
Notch ICD	Notch intracellular domain		

SARA	SMAD anchor for receptor activation	TGFβR	TGFβ receptor
SBE	SMAD-binding element	TLR	toll like receptor
SCP	Small C-terminal domain phosphatase	TME	transition mésenchymato-épithéliale
SDS	sodium dodécylsulfate	TNFα	tumor necrosis factor α
SIRT	sirtuine	TSC1	tuberous sclerosis complex
SMAD	SMAD family member	TWIST	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
Smurf2	SMAD Specific E3 ubiquitin protein ligase 2	ULK1	Unc-54-like Kinase 1
SNAI	Snail Family Transcriptional repressor 1	UPR	unfolded protein response
SNAP29	synaptosome associated protein 29	UTR	untranslated region
SNARE	N-éthymmalmeimide-sensitive factors (NSF) attachment protein	UVRAG	ultraviolet irradiation resistance associated gene
SOX2	SRY-Box transcription factor 2	VAMP8	vesicle associated membrane protein 8
SPHK1	Sphingosine kinase 1	VEGF	vascular endothelium growth factor
STAT	Signal transducer and activator of transcription	VEGFR2	vascular epithelium growth factor receptor 2
STX	syntaxin 17	VPS	vacuolar protein sorting
SVF	Sérum de veau foetal	WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2
TBS	tris buffered saline	Wnt	Wingless-integration 1 pathway
TCF	T cell factor	YKT6	YKT6 V-SNARE Homolog
TEM	transition épithélio-mésenchymateuse	ZEB	Zinc finger E-box binding protein
TGFβ	transforming growth factor β		

CADRE ET BUT DU TRAVAIL

Cette thèse débutée en septembre 2016, s'inscrit dans les travaux de l'équipe EA3922 « Œstrogènes, expression génique et pathologies du système nerveux central » qui a intégré en 2017 l'unité INSERM UMR1098 « Interactions Hôte-greffon tumeur ingénierie cellulaire et génique et qui fait partie du groupe nommé AETIC « Autophagy, Epigenetics and T-cell immunity in Cancer » dans l'équipe TIM-C (Thérapeutique Immuno-Moléculaire des cancers). Une des thématiques fondamentales de recherche du laboratoire est l'autophagie et particulièrement GEC1/GABARAPL1 (Glandular epithelial cell 1/GABA_A receptor-associated protein like 1) dont le gène a été identifié comme régulé positivement par les œstrogènes au sein de cette équipe (Pellerin et al., 1993). Mon projet consiste en l'étude de l'implication des protéines ATG8 (Autophagy related 8) et particulièrement de la protéine GABARAPL1 dans le cancer et dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM).

GABARAPL1 est une protéine de la famille ATG8 et de la sous-famille GABARAP (GABA_A receptor-associated protein). La famille ATG8 est aussi composée de la sous-famille MAP-LC3 (Microtubule-associated light chain 3) dont le membre LC3B est très étudié. Les membres de la sous-famille GABARAP : GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2/GATE16 (GABARAP like 2/Golgi associated ATPase enhancer of 16kDa) ont été initialement décrits comme impliqués dans les transports intracellulaires. Les protéines GABARAP et GABARAPL1 seraient impliquées dans le transport du récepteur GABA_A (γ -aminobutyric acid type A) (Mansuy et al., 2004), du N-Ethylmaleimide sensitive factor (Chen and Olsen, 2007) ou le transport du récepteur aux κ opioïdes en augmentant leur nombre à la surface cellulaire (Chen et al., 2011) alors que GABARAPL2, serait plutôt impliquée dans des transports intra-Golgien. D'autres travaux de notre équipe ont permis de mettre en évidence l'implication des protéines de la sous-famille GABARAP dans l'autophagie et de démontrer leur localisation au niveau des vésicules autophagiques (Chakrama et al., 2010; Kabeya et al., 2004).

Le rôle des protéines GABARAP lors de l'autophagie semble clair du fait de leur association aux membranes des vésicules autophagiques. En effet, ces protéines, comme les protéines LC3 possèdent une glycine en position C-terminale qui permet leur conjugaison à un phospholipide et ainsi leur association à la membrane des autophagosomes. Ces protéines seraient donc impliquées dans l'élongation de la membrane de la vésicule autophagique, dans sa fermeture et permettrait aussi les évènements de fusion avec le lysosome.

Des études ont été réalisées sur le rôle des protéines ATG8 lors de la carcinogénèse. Si l'expression des membres de la sous-famille LC3 semble variable en fonction du type de cancer, les membres de la sous-famille GABARAP seraient majoritairement décrits comme des gènes suppresseurs de tumeur. En effet, leur expression est plutôt diminuée dans les cancers et leur forte expression serait associée à un bon pronostic. Le rôle suppresseur de tumeur des protéines GABARAP serait dû à une dégradation sélective de composants cellulaires oncogéniques. Toutefois, les protéines GABARAP ont

été décrites comme ayant des rôles sous leur forme non lipidées par exemple dans les transports cellulaires suggérant que ces protéines pourraient aussi avoir un rôle dans le cancer indépendamment leur localisation au niveau des autophagosomes.

Lors de mon arrivée au laboratoire, un article démontrant les rôles de GABARAPL1 non lipidé dans la régulation des étapes précoces de l'autophagie et dans l'inhibition des phénotypes cancéreux *in vivo* était en cours de préparation. Mon rôle a donc été d'étudier le rôle de GABARAPL1 lipidé et non lipidé 1) dans les étapes précoces de l'autophagie par l'étude de la phosphorylation de ULK1 (Unc-54-like Kinase 1), 2) sur les phénotypes cancéreux *in vitro* et 3) de confirmer les résultats obtenus dans une autre lignée cellulaire de cancer du sein, les BT474. L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal Oncotarget.

Au cours de ma seconde et troisième année de thèse, je me suis focalisée sur le rôle de GABARAPL1 au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses. Lors de mon arrivée au laboratoire, les lignées cellulaires A549 (carcinome de poumon) et ACHN (adénocarcinome de rein issu d'un site métastatique) avaient préalablement été validées comme inductibles en TEM par un co-traitement TGF β (Transforming growth factor β)/TNF α (Tumor necrosis factor α). Des études avaient démontré que le rôle de l'autophagie au cours de la TEM était controversé. D'une part, une carence en acide aminé, induirait la TEM *via* les voies de l'autophagie. En effet l'inhibition de l'autophagie inhiberait l'induction de la TEM (Li et al., 2013). D'autre part, il avait été démontré que l'autophagie permettrait l'inhibition de la TEM *via* la dégradation d'acteurs de la TEM tels que certains facteurs de transcription. De plus, il avait été suggéré que cette dégradation par autophagie puisse être de type sélective (Grassi et al., 2015). Nous avons alors émis l'hypothèse que la protéine GABARAPL1 puisse être impliquée dans la TEM par son implication dans la dégradation sélective de facteurs de transcription de la TEM. Pour étudier le rôle de GABARAPL1 dans la TEM, nous avons réalisé des cellules A549 et ACHN KO GABARAPL1 par la technologie CRISPR/Cas9. Une publication sur le rôle de GABARAPL1 lors de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules cancéreuses est en cours de finalisation.

INTRODUCTION

I. Autophagie

1. Qu'est-ce que l'autophagie ?

Le terme autophagie a été utilisé pour la première fois par Christian de Duve en 1963 suite à sa découverte des lysosomes et ses observations sur la dégradation de mitochondries et d'autres compartiments cellulaires par les lysosomes dans des hépatocytes de rat (De Duve et al., 1955; Deter and de Duve, 1967). Ses travaux sur l'autophagie ont été récompensés par un prix Nobel de physiologie et médecine en 1974. Plus récemment, les travaux sur l'autophagie chez la levure de Yoshinori Ohsumi ont été récompensés en 2016 par un prix Nobel de médecine. Autophagie provient du grec « auto » et « phagein » signifiant se manger soi-même. C'est un mécanisme multi étapes de dégradation intracellulaire faisant intervenir les lysosomes et permettant l'élimination aléatoire d'une partie du cytoplasme, mais aussi d'amas de protéines ou encore d'organites endommagés afin de les recycler (Xie and Klionsky, 2007).

Il existe plusieurs types d'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA)(Figure 1). Lors de la macroautophagie, des cargos cytoplasmiques sont englobés dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome et suite à sa fusion avec un lysosome, le contenu est dégradé par les enzymes lysosomales. En revanche, lors de la microautophagie, des constituants cytoplasmiques sont directement englobés par les lysosomes suite à l'invagination de sa membrane. Les mécanismes de macro-autophagie et de micro-autophagie peuvent être des mécanismes sélectifs ou non. En revanche, lors de la CMA, des protéines endommagées ou anormales contenant la séquence KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) telles que les protéines α -synucléine, Tau ayant un rôle dans la neuroprotection (Cai et al., 2015) ou encore des protéines de la glycolyse telles que la GAPDH (Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase) et l'aldolase (Cuervo et al., 1994) sont dégradées. Ces protéines sont transloquées dans le lysosome grâce à la formation d'un complexe protéique avec des protéines chaperonnes telles que Hsc-70 (Heat shock cognate 70)(Dice et al., 1990). Ce complexe est reconnu par LAMP2A (lysosomal-associated membrane protein 2A), un récepteur de la membrane lysosomale permettant ainsi la translocation du complexe et sa dégradation (Cuervo and Dice, 1996).

Lors de ma thèse je me suis focalisée sur l'étude de la macroautophagie, appelée par la suite « autophagie ».

2. Mécanisme moléculaire de l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme hautement conservé de la levure aux mammifères. C'est un processus de dégradation intracellulaire au cours duquel une vésicule intracellulaire à double membrane d'abord appelé phagophore est formée pour englober les constituants cellulaires à

dégrader. Suite à l'élongation du phagophore et à sa fermeture, la vésicule est appelée autophagosome. C'est après une étape de fusion entre l'autophagosome et un lysosome (autolysosome) que les hydrolases et protéases lysosomales vont permettre la dégradation du contenu vésiculaire. Au cours de ce processus de nombreux complexes moléculaires vont permettre la régulation de l'autophagie. Tout d'abord, les complexes MTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) et AMPK (adenosin monophosphate associated protein kinase) vont permettre l'induction de l'autophagie en réponse à différents stress cellulaires tels que lors d'une carence en nutriments mais également lors de carence en glucose. Ces complexes vont ensuite permettre l'activation du complexe protéique ULK1 et PI3KC3-C1 (phosphatidylinositol 3 kinase de classe III complexe 1) aboutissant à l'initiation de l'autophagie.

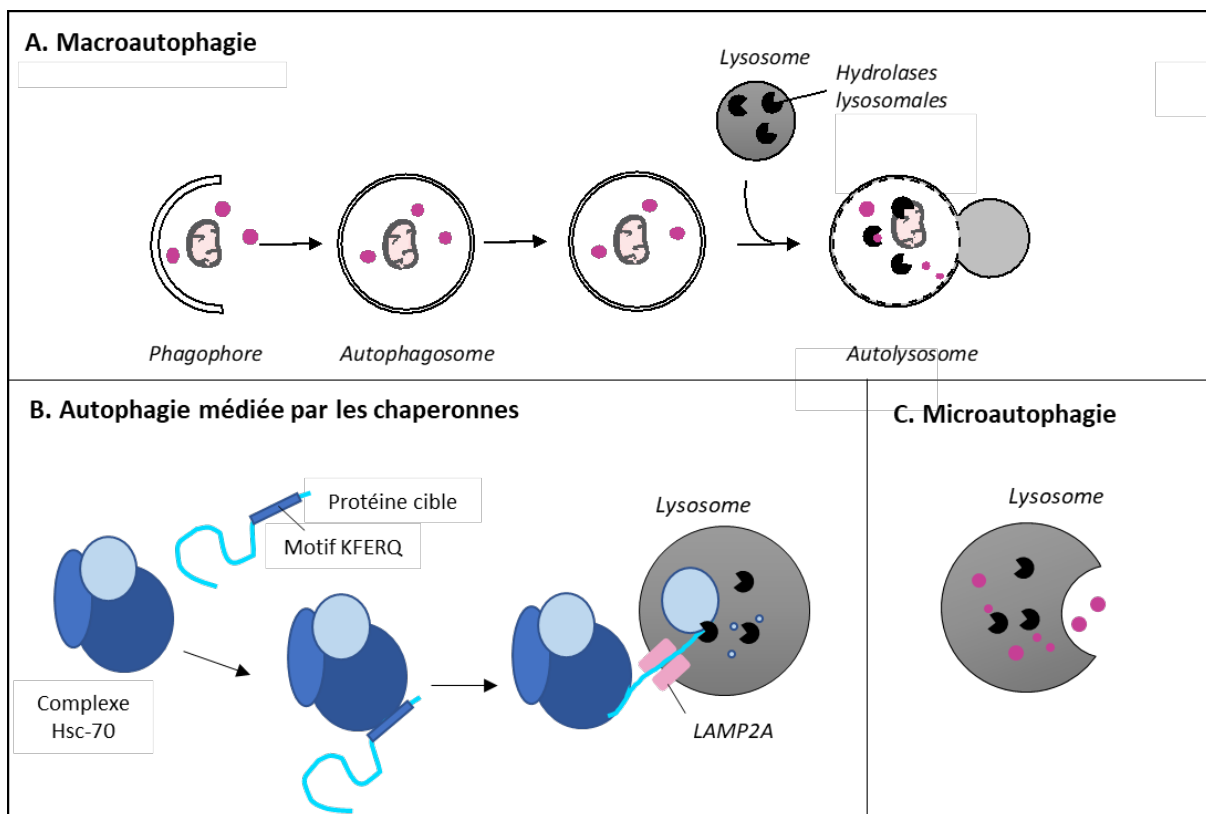


Figure 1 : Représentation schématique des trois types d'autophagie.

A. La macroautophagie est caractérisée par la formation d'une vésicule à double membrane appelée phagophore qui va englober des constituants cytoplasmiques pour être dégradés. Le phagophore après son élongation va se fermer et est appelé autophagosome. C'est suite à la fusion entre l'autophagosome et un lysosome (autolysosome) que les hydrolases lysosomales vont permettre la dégradation du contenu vésiculaire. **B.** L'autophagie médiée par les chaperonnes est caractérisée par sa sélectivité. En effet, des protéines endommagées ou anormales contenant la séquence KFERQ vont être reconnues par un complexe protéique Hsc-70 qui lui-même va être reconnu par la protéine lysosomale LAMP2A pour permettre la translocation du complexe protéique et sa dégradation. **C.** Au cours de la microautophagie, des constituants cytoplasmiques sont directement englobés par les lysosomes suite à l'invagination de sa membrane. Modifié d'après (Parzych & Klionsky, 2014).

Au cours du processus autophagique interviennent plus de 50 protéines ATG (Figure 2). Au cours de ma thèse, j'ai particulièrement étudié les protéines de la famille ATG8 et notamment la protéine GABARAPL1. La famille ATG8 est composée de deux sous-familles : la sous famille GABARAP composée de 3 membres GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 et la sous-famille MAP-LC3, appelée par la suite LC3 et composée de 5 membres LC3A avec deux variants d'épissage α et β , LC3B, LC3B2 et LC3C.

Les études ne discriminent généralement pas LC3A α de LC3A β et la protéine LC3B2 ne diffère que d'un acide aminé de la protéine LC3B. Actuellement, seulement peu d'études se sont intéressées aux rôles de LC3B2, ainsi nous ne l'aborderons pas dans ce manuscrit. Les protéines MAP-LC3 ont été identifiées comme intervenant majoritairement dans l'étape d'élongation de la membrane de l'autophagosome et les protéines GABARAP lors de la fusion autophagosome/lysosome. Cependant, il semblerait que leur rôle soit plus complexe qu'initialement décrit.

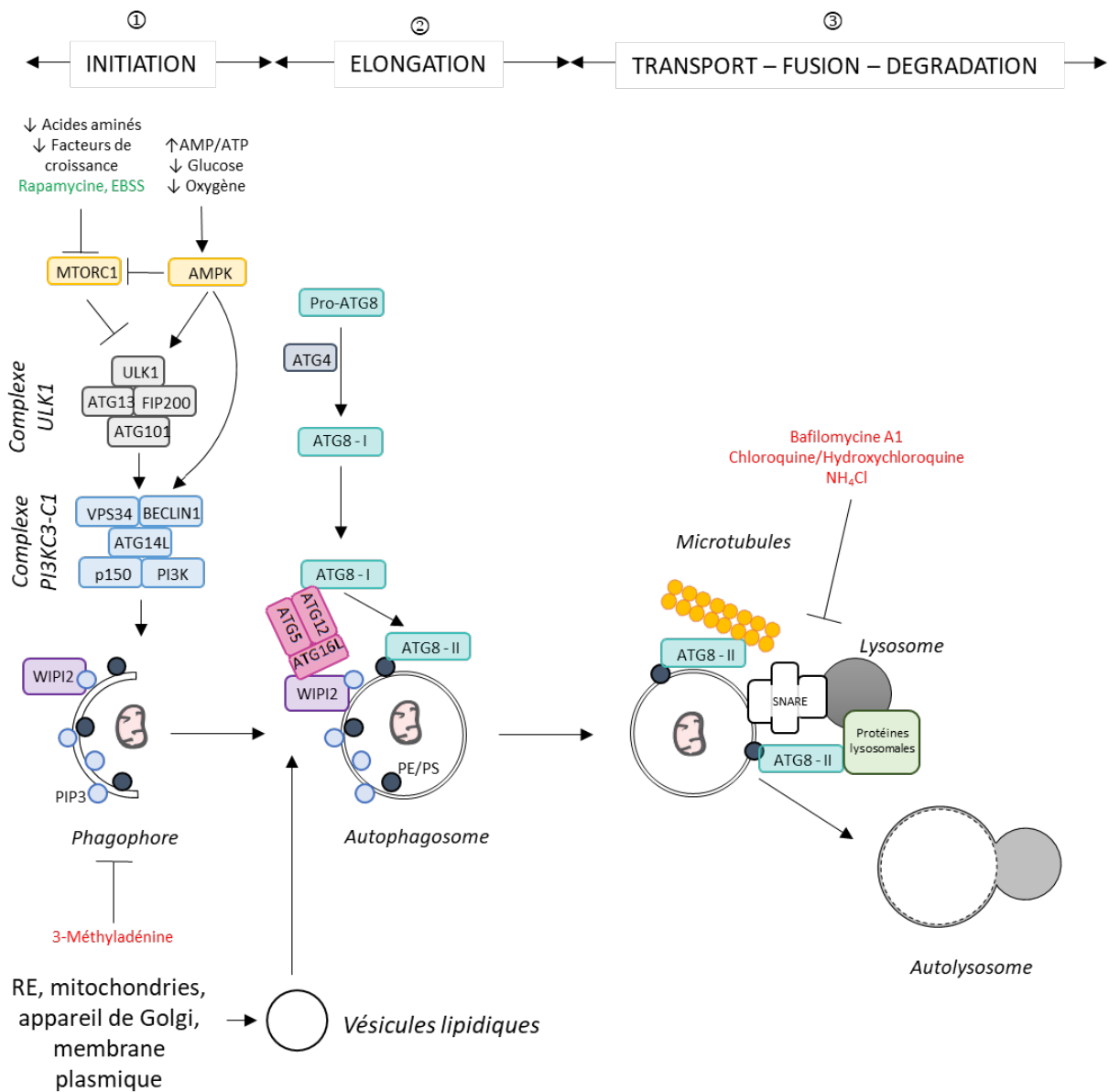


Figure 2 : Mécanisme moléculaire de l'autophagie

① L'autophagie peut être induite par des stress cellulaires (hypoxie, manque de nutriments...). Une double membrane appelée phagophore va se former. ② Les protéines ATG8 sont conjuguées à un phosphatidyléthanolamine (PE) ou à un phosphatidylsérine (PS) suite à leur clivage par la protéase ATG4 pour donner les formes ATG8-II liées aux autophagosomes. ③ Le phagophore s'allonge puis se ferme pour former l'autophagosome qui sera relocalisé au niveau d'un lysosome et suite à leur fusion, les enzymes lysosomales vont permettre la dégradation du contenu vésiculaire. Des inducteurs chimiques tels que l'EBSS (Earl's balanced salt solution) ou encore la rapamycine, un inhibiteur de MTOR permettent l'induction de l'autophagie. Des inhibiteurs chimiques peuvent permettre l'inhibition des étapes précoces (3-Méthyladénine) ou tardives (Bafilomycine A1, Chloroquine/Hydroxychloroquine et NH₄Cl). Schéma adapté (Deng et al., 2019)

L'autophagie est un processus multi étape qui consiste en une étape d'initiation (Figure 2, ①), d'élongation du phagophore (Figure 2, ②), de transport de l'autophagosome, de fusion avec un lysosome et de dégradation du contenu de l'autophagosome (Figure 2, ③).

2.1. Induction/initiation (Figure 2, ①)

En conditions de stress cellulaire, deux senseurs énergétiques MTOR (mammalian target of rapamycin) et AMPK vont permettre l'induction de l'autophagie *via* l'activation de complexes protéiques d'initiation ULK1 et PI3KC3-C1. L'étape d'initiation consiste en la formation d'une ébauche de vésicule à double membrane appelée phagophore au niveau du réticulum endoplasmique (Itakura and Mizushima, 2010; Reggiori et al., 2005). Les carences en acides aminés ou en facteurs de croissance vont permettre l'induction de l'autophagie *via* MTOR alors que lors d'une augmentation du ratio AMP/ATP, du manque de glucose ou d'oxygène, l'autophagie sera induite au moyen de AMPK. AMPK et MTOR sont deux kinases dont les rôles sur la régulation de l'autophagie sont opposés mais étroitement liés et qui sont capables de rendre compte du statut énergétique de la cellule et permettre l'induction de l'autophagie au moyen du complexe ULK1 composé de la sérine/thréonine ULK1, FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa), ATG13 et ATG101 (Hosokawa et al., 2009). L'activation de MTOR permet une inhibition de l'autophagie alors que l'activation de AMPK permet l'induction de l'autophagie (Figure 2, ① et Figure 3).

2.1.1 Le complexe ULK1

L'activité du complexe ULK1 est régulée par phosphorylation par les kinases MTOR et AMPK. MTOR et AMPK sont des senseurs énergétiques et leur activité dépend de la présence de nutriments tels que les acides aminés, le glucose et du ratio cellulaire AMP/ATP.

2.1.1.1 En présence de nutriments

MTORC1, complexe protéique composé de MTOR, Raptor (Regulatory associated protein of MTOR), PRAS40 (Proline-rich Akt substrate 40kDa, substrat d'Akt de 40 kDa, riche en proline) et mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), est relocalisé par les protéines Rag (Ragulator protein) au niveau de la membrane lysosomale ce qui permet son activation par Rheb (Ras homolog enriched in brain) inhibant ainsi l'autophagie (Carroll et al., 2016; Sancak et al., 2008, 2010). C'est la protéine Raptor qui interagit avec le complexe ULK1 et qui phosphoryle ULK1 au niveau de la sérine 757 et ATG13 au niveau de la sérine 258 ce qui conduit à l'inactivation de leur activité kinase. De plus, quand le ratio cellulaire AMP/ATP est faible et donc le niveau d'énergie fort, la kinase AMPK est inhibée (Figure 3).

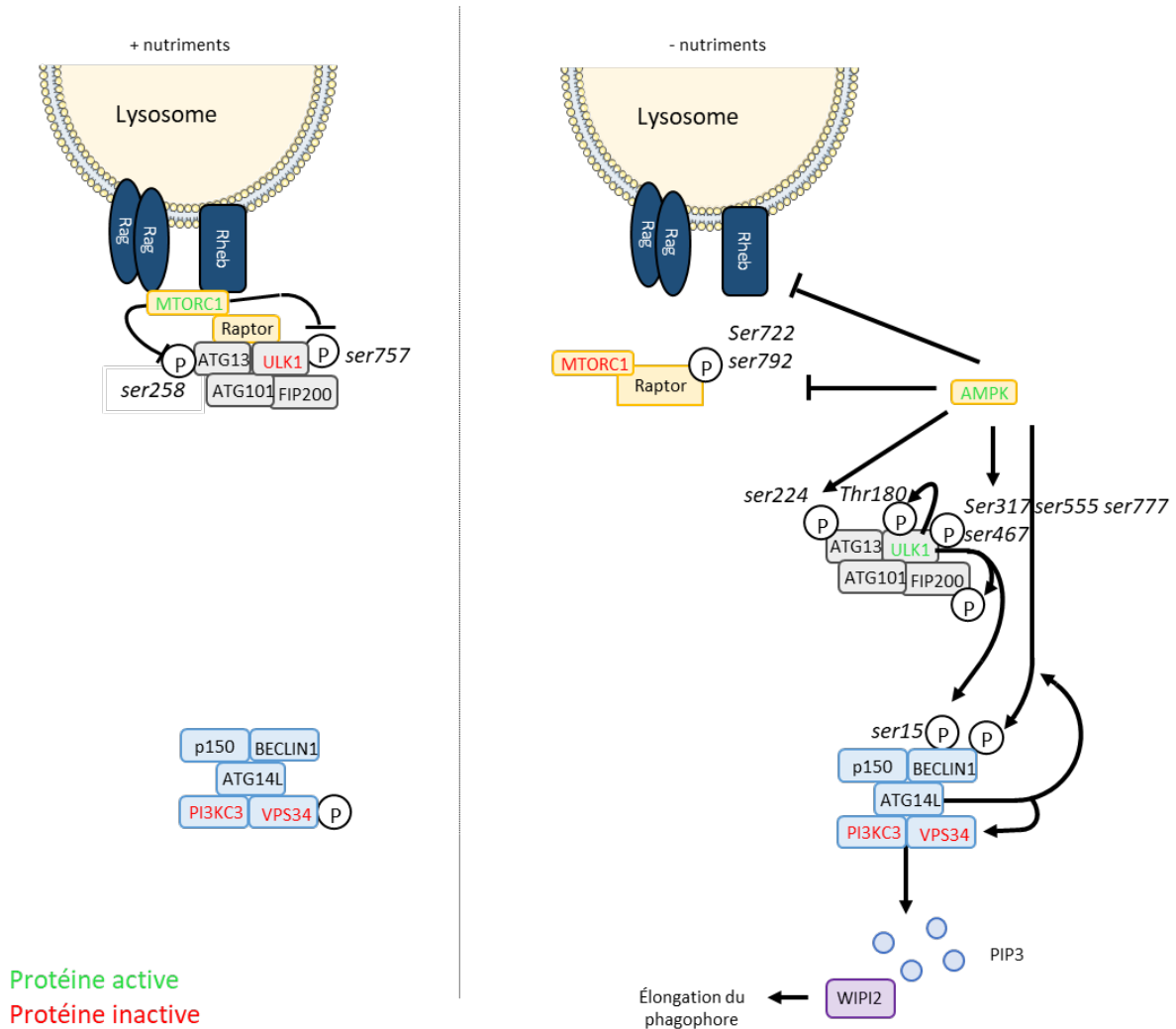


Figure 3 : Régulation de l'initiation de l'autophagie.

Complexe MTORC1 : En présence de nutriments, les protéines Rag permettent le recrutement de MTORC1 au niveau du lysosome permettant son activation par Rheb. MTORC1 actif, interagit avec ULK1 via Raptor et permet sa phosphorylation au niveau de la sérine 757 et la phosphorylation de ATG13 au niveau de la sérine 248 inhibant ainsi l'autophagie. ULK1 fait parti du complexe ULK1 composé également des protéines ATG13, FIP200 et ATG101.

Complexe ULK1 : En absence de nutriment, les protéines Rag ne recrutent plus MTORC1 au niveau de la membrane lysosomale et reste ainsi sous forme inactive ce qui ne lui permet plus d'interagir avec le complexe ULK1. ULK1 va ainsi s'autophosphoryler sur sa thréonine 180, ATG13 sur la sérine 224 et FIP200. Le complexe ULK1 sera relocalisé au niveau du site d'initiation de l'autophagie permettant l'induction de l'autophagie. Dans ces conditions énergétiques, AMPK est activée et permet 1) une inhibition de MTORC1 par phosphorylation de Raptor au niveau des sérines 722 et 792, 2) de phosphoryler ULK1 au niveau des sérines 317, 555, 777 ou 467 et ATG13 au niveau de la sérine 224 3) d'inhiber Rheb conduisant à l'inactivation de MTORC1 (Alers et al., 2012; Carroll et al., 2016).

Complexe PI3KC3-C1 : PI3KC3 permet la formation d'un complexe protéique composé de VPS34, p150, ATG14L et de BECLIN1. Le complexe PI3KC3-C1 peut être activé par la phosphorylation activatrice de BECLIN1 par ULK1, la phosphorylation de BECLIN1 par AMPK induite par ATG14L et le changement conformationnel de VPS34 induit par ATG14L empêchant sa phosphorylation inhibitrice. L'activation du complexe induit la génération de phosphatidylinositol-3 phosphate (PIP3) par la PI3KC3 permettant le recrutement des protéines WIPI2 impliquées dans l'élongation du phagophore.

2.1.1.2 En absence de nutriment

Lorsque les nutriments viennent à manquer, MTORC1 ne se trouve plus recruté au niveau des lysosomes, et n'est ainsi plus activé par Rheb. L'interaction entre Raptor et ULK1 n'a plus lieu ne permettant plus la phosphorylation inhibitrice du complexe ULK1. ULK1 va ainsi s'autophosphoryler sur

sa thréonine 180 et phosphoryler ATG13 sur la sérine 224 et FIP200 (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009; Lazarus et al., 2015; Puente et al., 2016). Le complexe ULK1 actif est alors transloqué au niveau du site d'initiation de l'autophagie (Karanasios et al., 2013) et permet le recrutement d'un second complexe : le complexe PI3KC3-C1. De plus, quand le ratio cellulaire AMP/ATP est fort et donc le niveau d'énergie faible, il y a fixation de l'AMP sur AMPK conduisant à son activation (Corton et al., 1995; Davies et al., 1995). Plusieurs mécanismes d'activation de l'autophagie *via* AMPK ont été décrits: i) AMPK peut phosphoryler directement ULK1 au niveau des sérines 317, 555, 777 ou 467 et ATG13 au niveau de la sérine 224 en réponse à une privation en nutriments conduisant à son activation (Egan et al., 2011; Puente et al., 2016), ii) AMPK peut inhiber MTORC1 par la phosphorylation de Raptor au niveau des sérines 722 et 792 (Gwinn et al., 2008) et iii) AMPK peut favoriser l'hétérodimérisation de TSC1 (Tuberous sclerosis complex 1) et TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) *via* la phosphorylation de TSC2 conduisant ainsi à l'inactivation de MTORC1 *via* Rheb (Inoki et al., 2003)(Figure 3).

2.1.2 Le complexe PI3KC3-C1

Intervient ensuite la kinase PI3KC3 (phosphatidylinositol 3 kinase de classe III) qui permet la phosphorylation du phosphatidylinositol pour générer du phosphatidylinositol-3 phosphate (PI3P) qui est nécessaire à l'initiation de l'autophagie (Itakura et al., 2008). PI3KC3 permet la formation du complexe PI3KC3-C1 (Figure 3) composé de la sous unité catalytique VPS34 (Vacuolar protein sorting 34), de la kinase VPS15/p150 (Vacuolar protein sorting 15), de BECLIN1 et de ATG14L (ATG14-like) qui permet le recrutement du complexe vers le site d'initiation de l'autophagie (Matsunaga et al., 2010). L'activation du complexe PI3KC3-C1 est réalisée à plusieurs niveaux. D'une part, ULK1 peut phosphoryler BECLIN1 (ser15) et d'autre part AMPK permet la phosphorylation de BECLIN1. De plus, ATG14L serait également impliquée dans l'activation de ce complexe en augmentant la phosphorylation de BECLIN1 par AMPK et également en permettant un changement conformationnel de VPS34 empêchant sa phosphorylation inhibitrice (Kim et al., 2013). La génération de PI3P par ce complexe au niveau de l'autophagosome naissant permettrait l'induction de l'élongation du phagophore *via* le recrutement d'autres protéines ATG et de PI3P-binding protéines telles que WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2) impliquées dans l'élongation du phagophore (Michell et al., 2006).

2.2. Elongation et maturation du phagophore (Figure 2, ©)

L'étape d'élongation consiste en l'allongement de la double membrane du phagophore pour aboutir à l'obtention d'une vésicule fermée l'autophagosome. Cette étape nécessite un apport de lipides fait intervenir plusieurs complexes protéiques qui sont des systèmes de conjugaison ATG12-

ATG5-ATG16L1 et ATG8 (Figure 2, © Figure 4) permettant l'élaboration de complexes moléculaires au niveau du phagophore. Suite à la fermeture du phagophore, l'autophagosome va fusionner avec un lysosome.

2.2.1 *Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1*

Au cours de l'élongation, le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 est formé puis relocalisé majoritairement au niveau de la membrane externe de l'autophagosome grâce à une interaction entre WIPI2 et ATG16L1 (Dooley et al., 2014; Wilson et al., 2014) et permet ensuite le recrutement et la lipidation des protéines ATG8 (Fujita et al., 2008; Lystad et al., 2019; Mizushima et al., 2001).

Lors de la formation du système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1, la protéine ATG12 est d'abord conjuguée à la protéine ATG5 grâce à un mécanisme similaire à celui de l'ubiquitylation. ATG12 est activée par ATG7 puis transférée sur ATG10 pour être ensuite conjuguée à ATG5 (Mizushima et al., 1998). C'est le complexe ATG12-ATG5 qui va interagir avec ATG16L1 formant ainsi le complexe ATG16L au niveau de la membrane de l'autophagosome (Figure 4)(Fujita et al., 2008; Mizushima et al., 2001).

2.2.2 *Le système de conjugaison ATG8*

La famille de protéines ATG8 est composée de deux sous-familles GABARAP et LC3. La sous-famille GABARAP est composée de 3 membres GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 alors que la sous-famille LC3 est composée de 5 membres LC3A α , LC3A β , LC3B, LC3B2 et LC3C. Ces protéines possèdent de fortes homologies de séquence (Figure 5) et une des caractéristiques communes est que ces protéines sont toutes conjuguées à un lipide au cours de l'autophagie permettant leur localisation au niveau de la membrane des autophagosomes. Les protéines ATG8 sont impliquées lors de nombreuses étapes de l'autophagie et en particulier lors des étapes d'élongation du phagophore, de fusion de l'autophagosome avec le lysosome et aussi au cours du processus d'autophagie sélective. L'implication des protéines ATG8 sera ainsi détaillé lors de la description de chacune des étapes de l'autophagie.

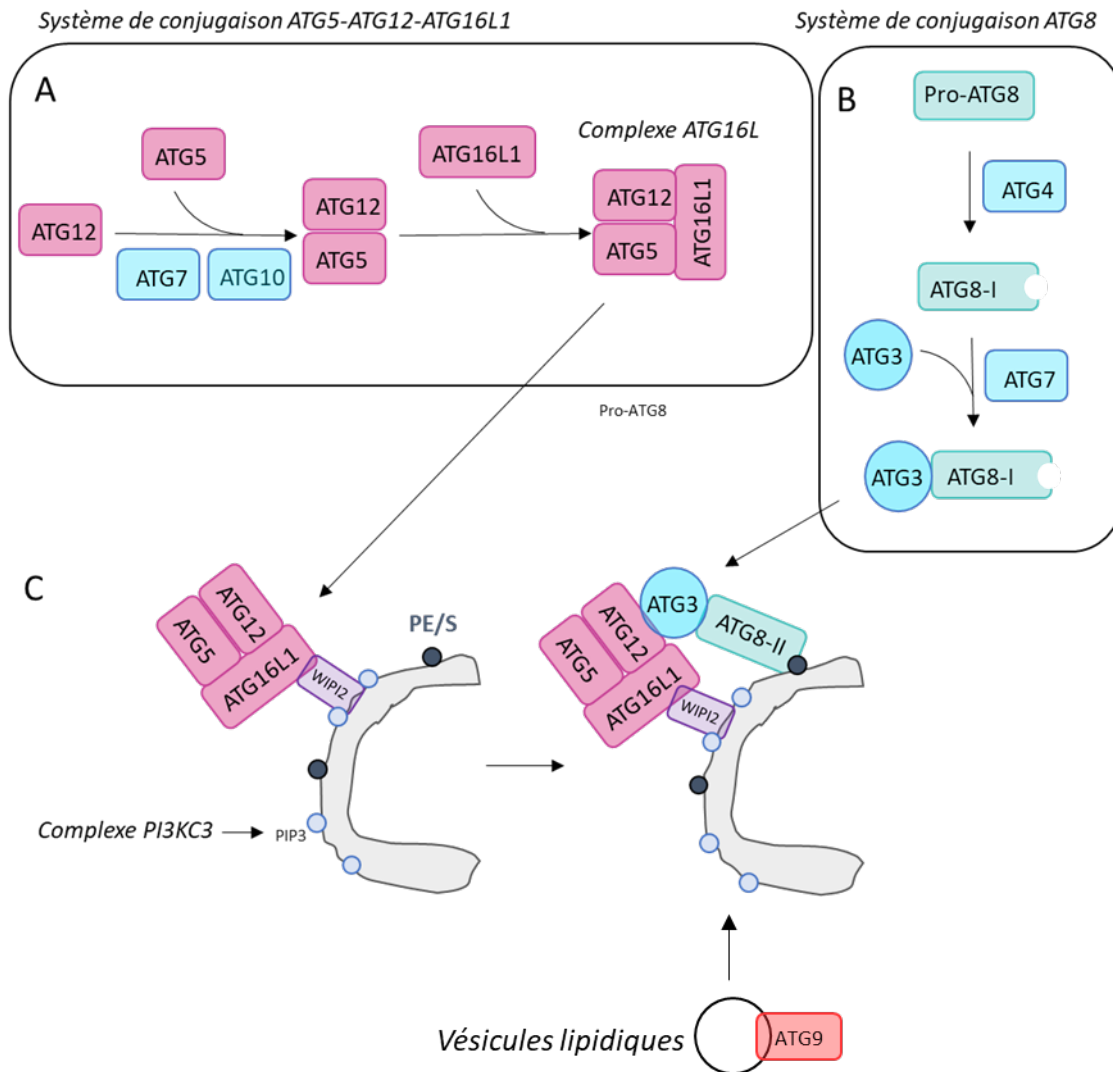


Figure 4 : Intervention des systèmes de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 et ATG8.

A. ATG12 est activée par ATG7 puis transférée sur ATG10 pour être conjuguée à ATG5. C'est le complexe ATG12-ATG5 qui interagit avec ATG16L1 formant ainsi le complexe ATG16L1 recruté au niveau du phagophore naissant et permettant le recrutement et la lipidation des protéines ATG8. **B.** Les protéines ATG8 synthétisées sous une pro-forme (pro-ATG8) sont premièrement clivées par ATG4 afin de libérer la glycine C-terminale donnant la forme mature ATG8-I. ATG8-I sont ensuite activées par ATG7 puis transférées sur ATG3. **C.** Le complexe ATG3-ATG8-I est recruté au niveau de l'autophagosome par le complexe ATG16L1. Les protéines ATG8-I sont ainsi localisées à proximité d'un phosphatidyléthanamine/sérine (PE/S) permettant leur conjugaison, donnant la forme ATG8-II liée aux autophagosomes. Le complexe PI3KC3 permet de générer du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) au niveau du phagophore naissant permettant le recrutement des protéines WIPI2. Ce sont les protéines WIPI2 qui permettraient le recrutement du complexe ATG16L1. Le matériel lipidique nécessaire à l'élongation du phagophore proviendrait des différents compartiments cellulaires grâce à des mécanismes de transport de vésicules lipidiques impliquant la protéine ATG9.

Le système de conjugaison ATG8 permet la conjugaison des protéines ATG8 avec le phosphatidylethanamine (PE) ou le phosphatidylsérine (PS)(Kabeya et al., 2004). Les protéines ATG8 sont synthétisées sous une pro-forme pro-ATG8 puis elles sont clivées au niveau de leur glycine en position C-terminale donnant la forme mature ATG8-I cytosolique. Ce sont les protéases ATG4A ou ATG4B qui interviennent pour le clivage de GABARAP et de GABARAPL2, ATG4D pour GABARAPL1 et ATG4B pour les protéines de la sous-famille LC3 (Kabeya et al., 2004). Les protéines ATG8-I sont ensuite transférées par ATG7 sur ATG3 (Tanida et al., 2004a). C'est cet intermédiaire ATG3-ATG8 qui serait recruté au niveau de l'autophagosome naissant à proximité d'un PE/S par le complexe ATG16L1 via une

interaction directe entre ATG3 et ATG12 tel qu'il a été décrit pour le recrutement de LC3 permettant ainsi sa lipodation (Figure 4)(Fujita et al., 2008; Hanada et al., 2007). Les protéines ATG8 localisées sur la membrane externe de l'autophagosome peuvent être déconjuguées grâce aux protéases ATG4 (Tanida et al., 2004b). Des modèles cellulaires où la glycine en C-terminale des protéines ATG8 est remplacée par une alanine empêchant ainsi leur lipodation ont été réalisés ce qui permet d'étudier le rôle des formes solubles de ces protéines (Alam et al., 2010; Dou et al., 2015; Kabeya et al., 2004; Liu et al., 2014).

1

GABARAP:	MKFVYKEEHP	FEKRRSEGEK	IRKKYPDRVP	VIVEKAPKAR	IGDLKKKYL	VPSDLTVGQF
GABARAPL1:	MKFQYKEDHP	FEYRKKEGEK	IRKKYPDRVP	VIVEKAPKAR	VPDLDKRKYL	VPSDLTVGQF
GABARAPL2:	MKWVMTFKEDHS	LEHRCVESAK	IRAKYPDRVP	VIVEKVSQS	IVDIDKRYL	VPSDITVAQF

LC3A α :	MPSDRPFKQR	RSFADRCKEV	QQIRDQHPSK	IPVIERYKYG	EKQLPVLDKT	KFLV β DHVN β M
LC3A β :	MKMRFFSSPC	GKAAVDPADR	CKEVQQIRDQ	HPSKIPVIE	RYKGEKQLPV	LDKT β KFLV β PD
LC3B:	MPSEKTFKQR	RTFEQRVEDV	RLIREQHPTK	IPVIERYKYG	EKQLPVLDKT	KFLV β DHVN β M
LC3C:	MPPPKIPSV	RFKQRKSLA	IRQEEVAGIR	AKFPNKIPV	VERYPRETFI	PPLDKTKFLV

61

GABARAP:	YFLJRKRIHL	RAEDALFFV	NNVIPPTSAT	MGQLYQEHE	EDFLYIAYS	DESVYGL-117
GABARAPL1:	YFLJRKRIHL	RPEDALFFV	NNTIPPTSAT	MGQLYEDNHE	EDYFLYVAYS	DESVYGLK-117
GABARAPL2:	MWIRKRIQL	PSEKALFLV	DKTVPQSSLT	MGQLYEKEKD	EDGFLYVAYS	GENTFGF-117

LC3A α :	SELVKIIRR	LQLNPTQAF	LLVNGHSMVS	VSTPIADIYE	QEKDEDGFLY	MVYASQETFG	F-121
LC3A β :	HVNMSSELVKI	IRRRQLNPT	QAFFLLVNGH	SMVSVSTPIA	DIYEQEKDED	GFLYMVYASQ	ETF-125
LC3B:	SELVKIIRR	LQLNANQAF	LLVNGHSMVS	VSTPISEVYE	SEKDEDGFLY	MVYASQETFG	MKLSV-125
LC3C:	QELTMTQFL	SIJRSRMVLR	ATEAFYLLVN	NKSLVMSAT	MAEIYRDYKD	EDGFVYMTYA	SQETFGCLSE AAPRDSSELE DRPCNPL-147

B

	GBP	GL1	GL2	LC3A α/β	LC3B	LC3C
GBP		87	58	31/31	31	39
GL1	87		61	34/35	32	39
GL2	58	61		41/42	39	42
LC3A α/β	31/31	34/35	41/42		82/86	59/58
LC3B	31	32	42	82/86		54
LC3C	39	39	42	59/58	54	



Figure 5 : Etude des séquences protéiques des ATG8 chez les mammifères.

A. Alignement des séquences protéiques des membres de la famille ATG8 chez les mammifères. Les structures secondaires ont été recherchées sur la plateforme d'archive de la structure des biomolécules The Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). La séquence tertiaire des 18 premiers acides aminés de LC3A β n'est pas à ce jour encore référencée. Toutefois, la structure tertiaire du reste de la protéine (acides aminés 18 – 125 est identique à celle de LC3A α).

B. Pourcentage d'identité entre les protéines ATG8 chez les mammifères. GBP : GABARAP; GL1 : GABARAPL1 et GL2 : GABARAPL2. LC3A possède deux variants d'épissage LC3A α et LC3A β dont les séquences protéiques de l'acide aminé 14 à 121 pour l'isoforme α et 18 à 125 pour l'isoforme β sont 100% identiques

L'implication des protéines ATG8 au cours de l'élongation du phagophore reste à ce jour encore flou. Toutefois, chez la levure, le taux d'ATG8 permet de réguler la taille des autophagosomes

(Abeliovich et al., 2000) et lorsque ces protéines sont déconjuguées de l'autophagosome, sa taille n'est plus modifiée (Xie et al., 2008). De plus, chez les mammifères, il a été montré que l'inactivation des protéines ATG8 conduit à une déficience dans l'élongation et la fermeture des autophagosomes (Fujita et al., 2008; Sou et al., 2008). Il a été également montré que l'inactivation de tous les membres de la famille ATG8 induit la formation d'autophagosomes plus petits mais entièrement formés, fermés et en nombre équivalent que lors de la présence de ces protéines (Nguyen et al., 2016) suggérant un rôle des protéines ATG8 dans l'élongation du phagophore.

Malgré le fait que l'implication des protéines ATG8 lors de l'élongation du phagophore soit encore mal compris, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que la présence des protéines ATG8 dans des vésicules lipidiques, et en particulier de leur région N-terminale, permettait leur agrégation et leur fusion (Landajuela et al., 2016; Nakatogawa et al., 2007; Weidberg et al., 2011). Toutefois, l'implication des protéines LC3 et GABARAP au cours de l'élongation serait différente puisqu'il apparaît que la présence des protéines GABARAP dans des vésicules lipidiques favoriserait d'avantage leur fusion que les protéines LC3. Ces résultats suggèrent que les protéines GABARAP possèdent des propriétés plus importantes dans la fusion que les protéines LC3 (Landajuela et al., 2016).

En plus de leur rôle dans l'élongation du phagophore comme décrit précédemment, les protéines ATG8 seraient aussi impliquées dans sa stabilisation (Knorr et al., 2014). Nous avons décrit précédemment que c'est le complexe ATG16L qui recrute les protéines ATG8 au niveau du phagophore induisant leur conjugaison. Toutefois, il a également été décrit que les protéines ATG8 suite à leur conjugaison peuvent également permettre le recrutement de ce complexe donnant ainsi naissance à une structure protéique de maillage autour de la vésicule nécessaire à la biogenèse du phagophore (Kaufmann et al., 2014; Weidberg et al., 2010).

En ce qui concerne la fermeture des autophagosomes, les mécanismes moléculaires ne sont pas encore bien compris. Cependant, il pourrait aussi faire intervenir les protéines ATG8 et en particulier les protéines GABARAP. En effet, il a été décrit que la surexpression d'un mutant ATG4B, inhibant la conjugaison des protéines LC3 mais pas des protéines GABARAP aboutit à l'obtention de vésicules plus petites alors que la surexpression d'un mutant ATG4A, inhibant la conjugaison des protéines GABARAP mais pas LC3 aboutit à l'obtention de vésicules ouvertes (Weidberg et al., 2010). Toutefois, une autre étude a mis en évidence que l'inactivation de toutes les protéines ATG8 ne modifie pas le nombre de vésicules fermées (Nguyen et al., 2016) suggérant que d'autres protéines interviennent également lors de la fermeture des autophagosomes.

2.3. Relocalisation des autophagosomes (Figure 2, ③)

Une fois l'autophagosome formé, avant de fusionner avec le lysosome pour permettre la dégradation du contenu vésiculaire, il doit rencontrer le lysosome (Figure 6). Les autophagosomes seraient formés dans le cytoplasme alors que les lysosomes seraient plutôt formés à proximité du centrosome. Leur rencontre nécessite ainsi la relocalisation des autophagosomes de la périphérie cellulaire vers le centrosome. Cette relocalisation impliquerait le mouvement des autophagosomes le long des microtubules *via* l'intervention de moteurs moléculaires et des protéines ATG8.

2.3.1 Les microtubules

La relocalisation des autophagosomes interviendrait par leur déplacement le long des microtubules grâce à l'intervention de moteurs moléculaires (Figure 6, ①). En effet, l'utilisation d'agents interférant avec la polymérisation des microtubules (cytochalasine B et D) a été décrite comme bloquant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Aplin et al., 1992). Cependant, leur implication n'est à ce jour que mal caractérisée. En effet, des études plus récentes ont mis en évidence que l'utilisation d'autres agents (Nocodazole) ne provoquent pas un blocage complet de l'autophagie (Fass et al., 2006; Jahreiss et al., 2008; Köchl et al., 2006).

2.3.2 Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires sont d'autres acteurs majeurs intervenant dans la relocalisation des autophagosomes. Les autophagosomes nécessitent un transport rétrograde, c'est-à-dire de la périphérie cellulaire vers le centrosome faisant ainsi intervenir les dynéines. Il a été montré que des mutations de ces moteurs moléculaires ou leur inhibition diminue la dégradation par autophagie (Ravikumar et al., 2005). D'autres protéines sont nécessaires afin de faire le lien entre l'autophagosome et ces moteurs moléculaires telles que les protéines ATG8 (Figure 6, ①).

2.3.3 Rôles des protéines ATG8

Les protéines ATG8 et en particulier les protéines LC3 seraient impliquées dans ces transports. En effet, il a été montré que la micro-injection d'un anticorps anti LC3 dans des cellules HeLa inhibe l'adressage des autophagosomes aux lysosomes (Kimura et al., 2008). Les protéines LC3 pourraient i) interagir directement avec les microtubules, ii) interagir directement ou iii) interagir indirectement avec les moteurs moléculaires eux-mêmes permettant le mouvement des autophagosomes le long des microtubules.

Les protéines LC3 ont initialement été identifiées comme des protéines MAP (Microtubule associated protein), protéines interagissant avec les microtubules. Cette interaction directe entre leur

domaine N-terminal et les microtubules pourrait permettre le mouvement des autophagosomes (Kouno et al., 2005; Mann and Hammarback, 1994). Toutefois, le modèle qui semble prédominé est l'intervention des protéines LC3 au sein de complexes protéiques. Tout d'abord les protéines LC3 pourraient interagir de manière directe (Kimura et al., 2008) ou indirecte avec les dynéines *via* les protéines FYCO (FYVE and coiled-coil domain-containing protein)(Olsvik et al., 2015; Pankiv et al., 2010) ou encore JIP1 (JNK-interacting protein group 1)(Fu et al., 2014) permettant ainsi la relocalisation des autophagosomes (Figure 6, ①).

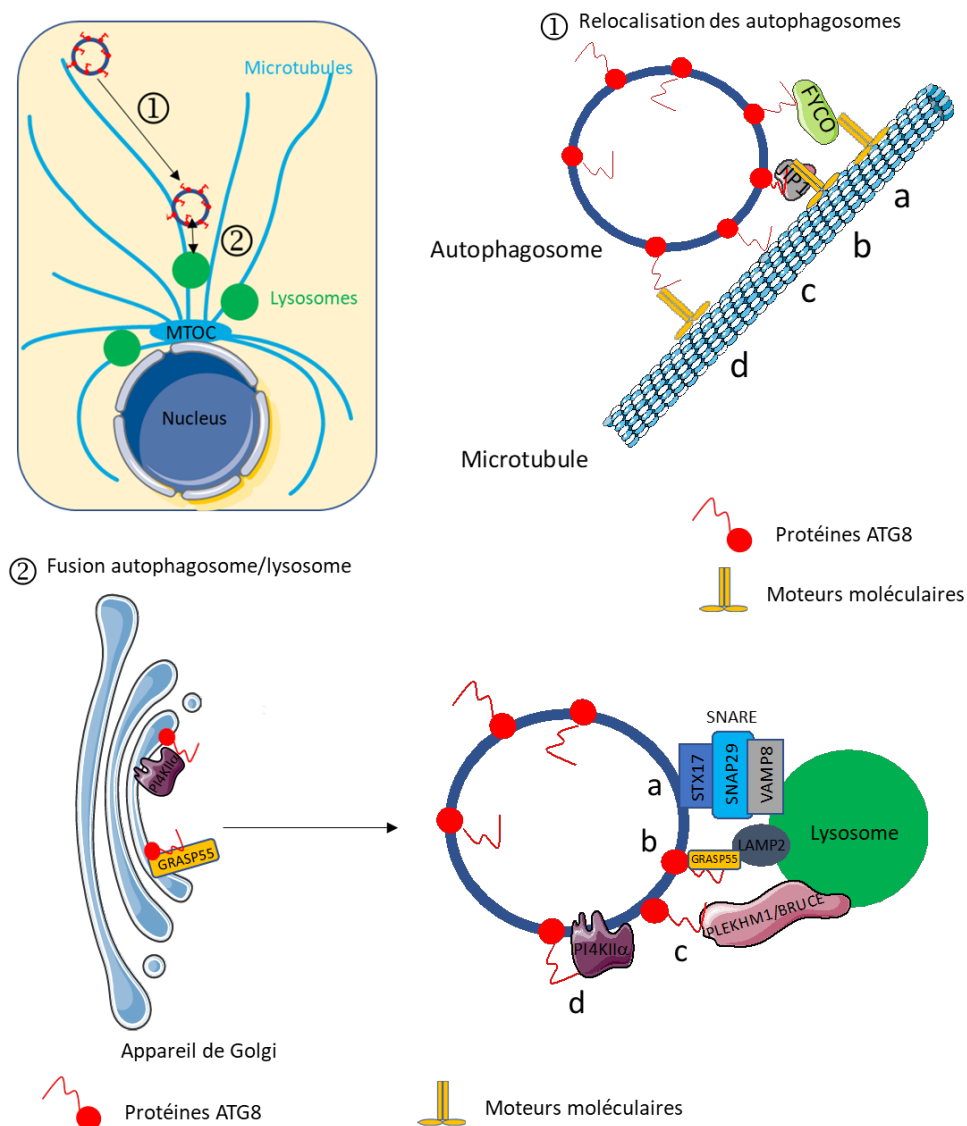


Figure 6 : Mécanisme de fusion autophagosome/lysosome.

① Les autophagosomes sont relocalisés de la périphérie cellulaire vers le centre organisateur des microtubules (MTOC) où se trouvent les lysosomes par le biais d'une interaction entre les protéines ATG8 et un moteur moléculaire a) via la protéine FYCO b) via la protéine JIP1. Les protéines ATG8 pourraient aussi interagir de manière directe c) avec les microtubules ou d) avec les moteurs moléculaires.

② La fusion autophagosome-lysosome nécessite la mise en place de ponts moléculaires entre l'autophagosome et le lysosome via a) la mise en place d'un complexe SNARE composé des protéines STX17, SNAP29 et VAMP8 (ou YKT6, SNAP29 et STX7), b) une interaction entre les protéines GRASP55 et LAMP2A, c) une interaction entre les protéines ATG8 et les protéines lysosomales PLEKHM1 et BRUCE et d) le recrutement de PI4KIIa facilitant les événements de fusion.

Les protéines GABARAP ont aussi été décrites comme pouvant interagir avec les microtubules (Wang and Olsen, 2000) et pourraient permettre le mouvement des autophagosomes le long des microtubules. Toutefois, à ce jour, les mécanismes permettant cette relocalisation restent flous.

2.4. Fusion autophagosome/lysosome (Figure 2, ③)

Suite à la rencontre entre l'autophagosome et le lysosome, les événements de fusion vont impliquer la mise en place de complexes moléculaires faisant un pont entre l'autophagosome et le lysosome. Les acteurs majeurs impliqués sont les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factors (NSF) attachment protein) ainsi que les protéines ATG8 (Figure 6, ②).

2.4.1 Les protéines SNARE

Les protéines STX17 (Syntaxin 17), SNAP29 (synaptosome associated protein 29) et VAMP8 (Vesicle associated membrane protein 8) sont les trois protéines SNARE majoritairement impliquées dans la fusion de la membrane de l'autophagosome et de la membrane lysosomale. Tout d'abord, la protéine STX17 est recrutée au niveau de la membrane externe de l'autophagosome *via* IRGM (Immunity related GTPase)(Itakura et al., 2012; Kumar et al., 2018). SNAP29 se lie à STX17 au niveau de l'autophagosome facilitant sa liaison avec VAMP8 localisée au niveau de la membrane (Itakura et al., 2012). Plus récemment, un autre complexe faisant intervenir les protéines SNARE, STX7-SNAP29-YKT6 (YKT6 V-SNARE Homolog), a été décrit (Matsui et al., 2018). Bien que les protéines SNARE facilitent la fusion entre deux membranes lipidiques, les événements de fusion nécessitent l'intervention d'autres facteurs protéiques tels que les protéines ATG8.

2.4.2 Implication des protéines ATG8

Tout d'abord, les protéines ATG8 possèderaient des propriétés les impliquant dans le mécanisme de fusion entre deux vésicules lipidiques comme il a été décrit précédemment (Paragraphe 2.2). D'autres part, elles pourraient intervenir comme protéines de recrutement des acteurs moléculaires nécessaires à la fusion. En effet, elles permettraient le recrutement des protéines lysosomales PLEKHM1 (pleckstrin homology domain containing protein family member 1) et BRUCE (BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme) dont l'inactivation inhibe la dégradation des autophagosomes *via* l'inhibition de leur fusion avec les lysosomes (Figure 6, ②). Toutefois, *in cellulo*, il semblerait que les protéines GABARAP recrutent plus efficacement PLEKHM1 que les protéines LC3 (McEwan and Dikic, 2015) et que de manière similaire, BRUCE interagisse préférentiellement avec GABARAP et GABARAPL1 qu'avec les autres protéines ATG8 (Ebner et al., 2018). De plus, les protéines ATG8 seraient également impliquées dans le recrutement de STX17 *via* IRGM impliqué dans la formation du complexe SNARE STX17-SNAP29-VAMP8 (Itakura et al., 2012; Kumar et al., 2018) mais aussi dans le

recrutement de PI4KII α (phosphatidylinositol 4-kinase II α) du Golgi vers les autophagosomes générant ainsi du phosphatidylinositol 4-phosphate (Wang et al., 2015) impliqué dans les événements de fusion (Albanesi et al., 2015). Bien que les protéines LC3 pourraient permettre le recrutement de PI4KII α lors de l'inactivation des protéines GABARAP, il semblerait que ce soit plutôt les protéines GABARAP qui interviennent dans ce recrutement (Vaites et al., 2018; Wang et al., 2015).

Ces résultats suggèrent un rôle préférentiel des protéines GABARAP dans les événements de fusion et un rôle moindre des protéines LC3. Toutefois, récemment il a été montré que la protéine Golgienne GRASP55 (Golgi reassembly-stacking protein of 55 kDa) pouvait être recrutée au niveau des autophagosomes dans des conditions de déficit cellulaire en glucose *via* les protéines LC3-II. GRASP55 interviendrait comme un pont protéique entre la protéine lysosomale LAMP2A et l'autophagosome facilitant ainsi les événements de fusion (Zhang et al., 2018a). Ces études sur les rôles des protéines ATG8 lors la fusion autophagosome/lysosome n'ont à ce jour que peu étudiées l'implication de GABARAPL2.

3. Autophagie sélective

3.1. Généralités

Le mécanisme d'autophagie tel que nous l'avons décrit précédemment permettant une dégradation aléatoire d'une partie du cytoplasme s'oppose à l'autophagie dite sélective qui permet une dégradation ciblée de cargos (Figure 7). Les cargos sont des protéines, des agrégats protéiques, des organites cellulaires tels que les mitochondries, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique ou encore le noyau qui sont éliminés par aggrephagie, mitophagie, pexophagie, ERphagie et nucléophagie respectivement. L'autophagie sélective est également impliquée dans la dégradation de pathogènes exogènes *via* la xénophagie.

L'autophagie sélective va permettre de réguler finement l'homéostasie cellulaire en éliminant les organites et les protéines ciblés, devenus obsolètes ou endommagés. L'autophagie sélective débute par un signal, généralement l'ubiquitinylation, permettant la reconnaissance de ces protéines ou de ces organites par des adaptateurs. Ces adaptateurs vont ainsi permettre d'apporter le cargo au niveau du phagophore par des interactions avec les protéines ATG8 conduisant à sa dégradation (Anding and Baehrecke, 2017).

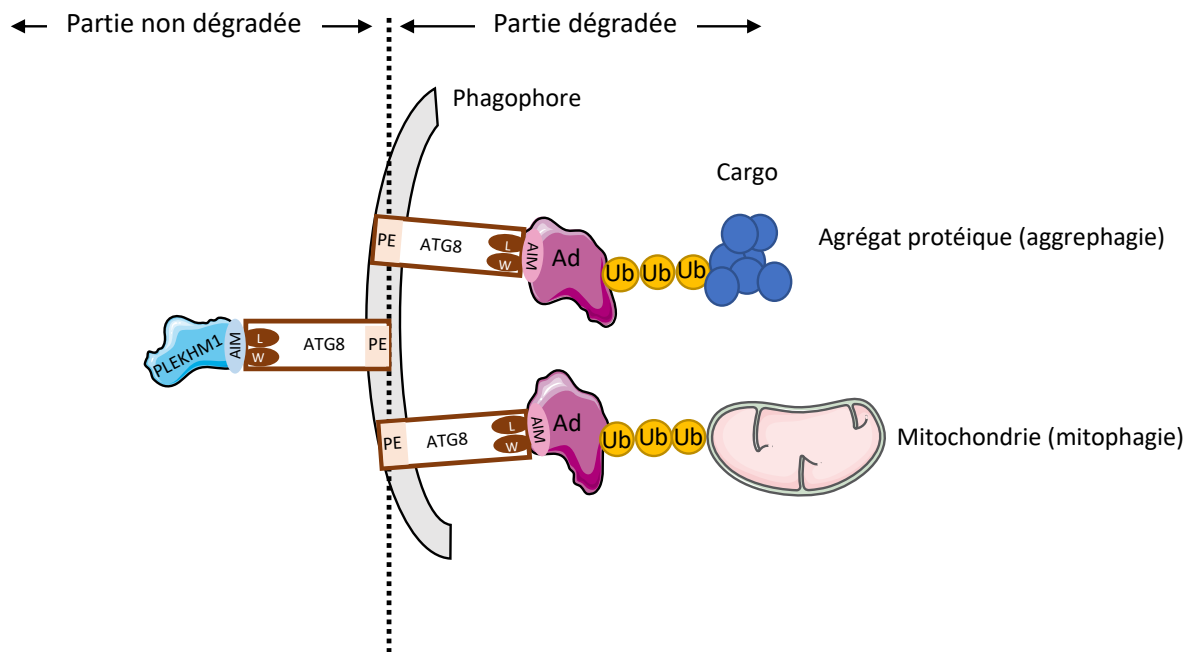


Figure 7 : Mécanisme de l'autophagie sélective

L'autophagie sélective permet la dégradation de cargos ubiquitinylés grâce à leur reconnaissance par des adaptateurs (Ad). Les protéines ATG8 sont ancrées dans la membrane du phagophore grâce à leur lipodation au phosphatidyléthanolamine/sérine (PE/S) et permettent le recrutement des complexes adaptateurs-cargos au niveau de leurs poches W et L par le motif AIM des protéines cibles ou des adaptateurs pour conduire à leur dégradation.

Le recrutement de protéines par les membres de la famille ATG8 permet aussi d'apporter au niveau de la membrane externe de l'autophagosome des facteurs nécessaires au bon déroulement de l'autophagie tel que PLEKHM1 impliqué dans le processus de fusion autophagosome/lysosome. Dans ce cas, ces protéines ne sont pas dégradées par autophagie.

3.2. Rôles des protéines ATG8 dans l'autophagie sélective

Au cours de l'autophagie sélective, les protéines ATG8 vont permettre le recrutement du cargo lié à son adaptateur à dégrader au niveau des autophagosomes. Ce recrutement est généralement permis grâce à deux poches hydrophobes L et W des protéines ATG8 et les motifs AIM (ATG8 interacting motif) des protéines cargo ou des protéines cibles appelés LIR (LC3-interacting motif) pour les protéines LC3 correspondant à la séquence (W/F/Y)-X₁-X₂-(L/V/I) et appelés GIM (GABARAP interacting motif) pour les protéines GABARAP correspondant à la séquence (W/F)-(V/I)-X-V (Rogov et al., 2014, 2017).

La spécificité de l'autophagie sélective peut intervenir à plusieurs niveaux : premièrement l'adaptateur mis en jeu puis la protéine ATG8 impliquée. En effet, à ce jour une douzaine d'adaptateurs ont été décrits. Certains sont impliqués dans de nombreux types d'autophagie sélective comme p62 dans l'aggrephagie, la xénophagie ou encore la mitophagie (Xu et al., 2015) et peut coopérer avec d'autres adaptateurs tel que NBR1 (neighbour of BRCA1) dans le cadre de l'aggrephagie (Kirkin et al., 2009). D'autres seraient plus spécifiques d'un type d'autophagie sélective tel que NIX (Nip-like protein X) au cours de la mitophagie lors de la maturation des réticulocytes (Novak et al., 2010). Puis, il a été décrit que ce sont les protéines GABARAP qui seraient majoritairement impliquées dans la mitophagie médiée par PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)/Parkin (Parkinsonian protein) alors que les LC3 ne seraient pas essentielles (Nguyen et al., 2016). Ces observations suggèrent que certains récepteurs

interagiraient préférentiellement avec les membres d'une sous-famille ATG8 ou même préférentiellement avec une protéine ATG8. En effet, p62, NBR1 et Optineurine ont été décrites comme interagissant avec toutes les protéines ATG8 (Johansen and Lamark, 2011; Wild et al., 2011) alors que NDP52 (Nuclear dot protein of 52 kDa) interagirait spécifiquement avec LC3C au cours de la xénophagie (von Muhlinen et al., 2012). De plus, lors de la mitophagie, il a été décrit que NIX pourrait interagir avec toutes les protéines ATG8 mais plus faiblement avec LC3B (Novak et al., 2010) alors que BNIP3 et FUNDC1 (FUN14-domain containing protein 1) interagissent préférentiellement avec LC3B et FKBP8 (FK506 binding protein 8) avec LC3A (Bhujabal et al., 2017; Hanna et al., 2012; Liu et al., 2012).

L'implication des protéines ATG8 au cours de l'autophagie sélective pourrait ainsi être un mécanisme sélectif par la mise en place d'interactions spécifiques ATG8/récepteur mais également d'interaction spécifique cargo/récepteur. Toutefois, d'autres études mettant en lumière ces interactions devront être réalisées.

Le recrutement sélectif de protéines ou d'organites par les protéines ATG8 au niveau des autophagosomes permettent de les cibler pour aboutir à leur dégradation. Toutefois, les protéines ATG8 localisées au niveau de la membrane externe de l'autophagosome seraient aussi impliquées dans un recrutement de protéines vouées au bon déroulement de l'autophagie tel qu'il a été décrit lors des évènements de fusion où les protéines GABARAP permettent le recrutement de PLEKHM1, BRUCE ou encore PI4KII α (Voir paragraphe 1.2.4 Fusion autophagosome/lysosome). Dans ce cas, ces protéines sont apportées au niveau de la membrane externe de l'autophagosome et ne seront pas dégradés par autophagie.

4. Autophagie et fonctions biologiques

L'autophagie est un mécanisme qui se déroule de manière basale dans toutes les cellules (Birgisdottir et al., 2013) permettant un contrôle de la qualité intracellulaire. L'autophagie aurait tout d'abord des rôles dans le développement et la morphogénèse. Puis, dans les tissus différenciés, le niveau d'autophagie varie d'un tissu à l'autre suggérant que ce mécanisme soit plus important dans certains organes que d'autres. En effet, il a été largement décrit que l'autophagie se déroule à un niveau très élevé dans le foie ou encore dans les neurones (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

L'autophagie est également un mécanisme de réponse aux stress cellulaires permettant le recyclage de constituants cellulaires et donc la production de substrats nécessaires au maintien du métabolisme cellulaire (Rabinowitz and White, 2010). De nombreux stress ont été décrits comme induisant l'autophagie : l'hypoxie, les stress oxydants, l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) ou encore les carences en nutriments. Cependant, en cas de stress trop important, l'autophagie peut également conduire à la mort cellulaire par apoptose ou à la mort

autophagique (Galluzzi et al., 2008). Il est donc facilement compréhensible que des perturbations de l'autophagie aient été décrites comme impliquées dans le développement de nombreuses pathologies.

4.1. Développement et maintien des caractéristiques de cellules souches

Le développement nécessite de profonds changements cellulaires. Les cellules pluripotentes possédant des capacités d'auto-renouvellement vont subir des étapes de différenciation cellulaire. L'autophagie serait impliquée dans le maintien des propriétés d'auto-renouvellement mais également dans la différenciation. En effet, il a été décrit que l'altération prolongée de l'autophagie inhibe la transcription des gènes impliqués dans la maintenance des capacités d'auto-renouvellement cellulaire (Sharif et al., 2017). Ces régulations pourraient impliquer la dégradation de facteurs de transcription de ces gènes par autophagie. Le maintien des capacités d'auto-renouvellement cellulaire est une des caractéristiques des cellules cancéreuses. L'implication de l'autophagie dans ce processus sera décrite dans la partie II. Autophagie et cancer.

Les cellules indifférenciées pour se spécialiser, mettent en place des structures impliquées dans la formation de tissus différenciés ce qui nécessite la dégradation de protéines devenues obsolètes par autophagie ou par le protéasome, une autre voie catabolique, et la synthèse de nouvelles protéines spécialisées. L'autophagie intervient également lors de changements phénotypiques des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales (TME) ou de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (TEM). La TEM et la TME sont impliquées dans le développement ou encore la réparation tissulaire mais sont également impliquées dans la carcinogenèse et particulièrement dans la résistance aux traitements ainsi que dans la formation des métastases. Le rôle de l'autophagie au cours de la TEM sera ainsi détaillé dans la partie III. TEM – Cancer et lien TEM – Autophagie.

4.2. Autophagie et réponse aux stress cellulaires

4.2.1 ERO et hypoxie

Le stress oxydant est dû à la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont majoritairement produites par les mitochondries lors des phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire mitochondriale. Lorsque les mitochondries sont normales, les ERO sont présentes à un faible niveau et interviennent en tant que molécules de signalisation cellulaire dans de nombreuses voies. En revanche, en cas de dysfonctionnement mitochondrial, leur présence peut augmenter et conduire à des dommages au niveau protéique, lipidique ainsi qu'au niveau de l'ADN (Cross et al., 1987; Gough and Cotter, 2011).

Les ERO ont été décrites comme des inducteurs de l'autophagie. La régulation de l'autophagie par les ERO peut aussi faire intervenir AMPK. Premièrement, l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est fréquemment associée à une augmentation du ratio AMP/ATP conduisant à l'activation de l'autophagie (Choi et al., 2001) comme décrit précédemment dans le paragraphe 1.2.1. Induction/initiation. De plus, les ERO peuvent également directement oxyder AMPK conduisant à un changement conformationnel et à l'activation de la kinase (Zmijewski et al., 2010). La production excessive de ERO est généralement due à un dysfonctionnement mitochondrial. Ainsi, les ERO sont aussi un signal conduisant l'induction de la mitophagie pour permettre l'élimination des mitochondries endommagées pour favoriser le retour à un état normal du niveau de ERO. En effet, HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) induit l'expression de BNIP3 (Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3) conduisant à l'inhibition de l'interaction entre BECLIN1 et Bcl-2 (B cell lymphomas 2) conduisant à l'induction de l'autophagie. De plus, BNIP3 est un récepteur impliqué dans la mitophagie (Novak et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Les ERO peuvent également conduire à l'altération de l'ADN. Ce stress génotoxique active p53 conduisant à l'inhibition de MTOR *via* AMPK et TSC1/TSC2 (Feng et al., 2005).

Les ERO seraient également essentielles pour la formation des autophagosomes. En effet, le peroxyde d'hydrogène va permettre d'inhiber la déconjugaison des protéines ATG8 en inhibant l'activité d'ATG4 par mécanisme d'oxydoréduction conduisant à une augmentation de la lipodation des ATG8 et de l'autophagie (Scherz-Shouval et al., 2007). De plus, il a été montré que ATG4A, qui permet la déconjugaison de GABARAPL2, serait active uniquement en présence d'agents réducteurs (Scherz-Shouval et al., 2003). Les ERO ont également été décrites comme permettant l'oxydation de p62 conduisant ainsi à son oligomérisation, étape nécessaire pour son association avec des protéines ubiquitinylées et pour leur dégradation par autophagie (Carroll et al., 2018).

L'hypoxie, manque d'apport en oxygène, conduit à l'activation de l'autophagie. En réponse au manque d'oxygène, le facteur de transcription HIF-1 est stabilisé et transloqué dans le noyau pour permettre l'activation de la transcription de gènes en réponse à l'hypoxie. De nombreux gènes de l'autophagie sont régulés par HIF-1 : *PI3KC3*, *ATG5*, *ATG7*, *BECLIN1* (Daskalaki et al., 2018). L'hypoxie peut également conduire à l'activation de l'autophagie *via* AMPK du fait de l'augmentation du ratio AMP/ATP.

4.2.2 Réponse aux stress du RE

Le repliement des protéines intervient au niveau du réticulum endoplasmique et peut impliquer la mise en place de ponts disulfures intramoléculaires particulièrement retrouvés dans les protéines sécrétées. Au cours du repliement protéique, du peroxyde d'hydrogène est produit et consommé

expliquant un lien étroit entre le repliement protéique et le taux de ERO intracellulaires. De ce fait, des perturbations de l'homéostasie des ERO peut conduire à un stress du RE provoquant la réponse UPR (Unfolded protein response) afin de restaurer l'homéostasie cellulaire par l'activation des gènes impliqués dans le repliement protéique mais également par l'activation de la machinerie antioxydante. De plus, il existe d'autres stress induisant une réponse UPR tels qu'une altération du stockage du calcium, une altération de l'homéostasie lipidique ou encore l'altération de la glycosylation protéique. Un des mécanismes de réponse au stress du RE est l'autophagie (Buchberger et al., 2010). L'autophagie permet l'élimination du RE endommagé (ERphagie) et également des agrégats protéiques (aggrephagie). Au cours de la réponse UPR, trois acteurs majoritaires sont impliqués : PERK (PKR-like eIF2 α kinase), ATF6 (Activating transcription factor 6) et IRE1 (Inositol requiring enzyme 1). En condition normale, ces trois acteurs sont inactifs et c'est l'accumulation de protéines mal repliées qui va permettre leur activation. Les protéines PERK et ATF6 agissent comme inducteurs de l'autophagie alors que le rôle de IRE1 dans l'autophagie reste controversé et pourrait intervenir dans la régulation de l'autophagie induite par UPR *via* une boucle de rétrocontrôle (Kroemer et al., 2010; Zhang et al., 2018c). Tout d'abord PERK permet l'induction de l'autophagie *via* l'activation transcriptionnelle de gènes de l'autophagie (Rouschop et al., 2010). En effet, PERK permet la phosphorylation de eIF2 α (eukaryotic initiation factor-2 α) conduisant à la traduction de l'ARNm ATF4 (Activating transcription factor 4). ATF4 augmente l'expression de CHOP (C/EBP homologous protein) qui va induire la transcription de *ATG5*, *ATG12*, *ATG3*, *BECLIN1*, *ATG16L1*, *p62*, *NBR1*, *ATG7*, *ATG10*, *GABARAP* et *LC3* conduisant à l'autophagie (B'chir et al., 2013; Kouroku et al., 2007). De plus, l'inactivation d'ATF6 a été décrite comme inhibant l'autophagie (Wang et al., 2014).

4.2.3 Carence en nutriments

Les carences en nutriments (acides aminés ou glucose) sont des inducteurs de l'autophagie mettant en jeu AMPK, MTOR ainsi que les sirtuines.

Une privation en glucose décroît l'ATP cellulaire augmentant ainsi le ratio AMP/ATP induisant l'activation d'AMPK diminuant la consommation d'ATP (Shaw, 2009) et activant l'autophagie. De manière similaire, il a été décrit qu'une privation en glucose permet l'activation de l'autophagie *via* une relocalisation nucléaire des facteurs de transcription FoxO (Forkhead box transcription factors of the O class) (Webb and Brunet, 2014). En effet, les protéines FoxO sont impliqués dans la régulation de gènes de l'autophagie tels que *GABARAPL1*, *LC3*, *PI3K* (Phosphatidylinositol 3 kinase), *BNIP3*, *BECLIN1*, *ATG4B* ou encore *ATG12* conduisant à une activation de l'autophagie (Sengupta et al., 2009).

Plus récemment, il a été décrit que les sirtuines permettraient une régulation de l'autophagie lors d'une carence en nutriments ou d'énergie de manière indépendante de MTOR ou d'un stress du RE

(Haigis and Sinclair, 2010). Les sirtuines sont des désacétylases dépendantes du NAD. Par exemple, SIRT1 (Sirtuine 1) permet la désacétylation de protéines ATG aboutissant à la régulation de l'autophagie pour répondre aux besoins cellulaires actuels (Lee et al., 2008). En effet, l'acétylation de LC3 inhiberait sa lipodation ainsi sa désacétylation serait nécessaire pour l'induction de l'autophagie. De plus, il a été décrit que la désacétylation de LC3 par SIRT1 permettrait également la relocalisation des protéines LC3 nucléaires, réservoir de protéines LC3, dans le cytoplasme (Huang and Liu, 2015). De plus, SIRT1 permet également la désacétylation de FoxO3a conduisant à une augmentation de l'expression de BNIP3 (Lee et al., 2008) impliqué dans l'activation de la mitophagie (Ishihara et al., 2013). Lors d'une carence en sérum, SIRT2 ne peut plus désacétyler FoxO1. FoxO1 interagit ainsi avec ATG7 conduisant à l'activation de l'autophagie (Zhao et al., 2010).

Finalement, lors d'une carence en nutriment, la production de ERO va permettre l'induction de l'autophagie comme décrit précédemment dans le paragraphe I.4.2.1 ERO et hypoxie.

L'hypoxie et les carences en nutriment sont des conditions généralement retrouvées au niveau de la tumeur. Ainsi l'induction de l'autophagie serait un mécanisme d'adaptation des cellules tumorales permettant ainsi leur survie (voir II.2.2.1 Autophagie, carence nutritive et hypoxie).

4.3. Autophagie et pathologies

Au vu des nombreux rôles de l'autophagie dans les processus biologiques, des perturbations de l'autophagie ont été décrites comme impliquées dans de nombreuses pathologies : les maladies neurodégénératives (Huntington, Alzheimer), les maladies cardiaques (athérosclérose), l'inflammation, lors d'infection par des bactéries (tuberculose) ou des virus (dengue), la mucoviscidose ainsi que dans le cancer. Ces maladies sont généralement caractérisées par l'accumulation de protéines mutées ou mal repliées et à une déficience de l'autophagie ne permettant plus leur élimination. Par exemple dans le cas de la mucoviscidose, maladie due à des mutations dans le gène codant pour le transporteur des ions chlorure CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), seulement 20 à 40% des protéines arrivent à maturation et les autres protéines sont vouées à la dégradation. Un défaut de dégradation de ces protéines par autophagie conduit à un cercle vicieux inflammatoire et une des stratégies thérapeutiques actuelles est une activation de l'autophagie afin de permettre l'élimination de ces protéines anormales (Luciani et al., 2012). De manière similaire, au cours de la carcinogenèse, l'autophagie permettrait l'élimination d'organites endommagés et de protéines oncogéniques inhibant ainsi la progression tumorale. Toutefois, dans le cas du cancer, l'autophagie permet également de fournir des substrats métaboliques aux cellules cancéreuses et serait ainsi impliquée dans la progression tumorale. Ce double rôle de l'autophagie dans le cancer nous intéresse particulièrement et sera détaillé ci-après.

II. Autophagie et cancer

Au cours de la carcinogenèse, l'autophagie aurait des rôles opposés dépendant du contexte cellulaire. En effet, stimuler ou inhiber l'autophagie sont des stratégies actuellement utilisées en clinique pour augmenter la survie des patients et suggèrent un rôle de cytoprotection ou de cytotoxicité de l'autophagie. L'autophagie agirait premièrement comme un mécanisme suppresseur de tumeur par la maintenance de l'intégrité génomique, la prévention de la prolifération cellulaire et de l'inflammation inhibant ainsi l'initiation de la carcinogenèse. En revanche, dans des tumeurs établies, l'autophagie permettrait aux cellules tumorales de survivre dans un microenvironnement tumoral hostile (Bishop and Bradshaw, 2018). De nombreux acteurs de l'autophagie sont ainsi impliqués dans la carcinogenèse, par exemple les protéines ATG8 dont la sous-famille GABARAP a majoritairement été décrite comme suppresseur de tumeur. Le rôle de ces protéines sera décrit ci-après dans la partie II.3 ATG8 et cancer.

Une des étapes clés dans la progression tumorale est la formation des métastases. En effet, la dissémination des cellules cancéreuses à travers l'organisme réduit considérablement les chances de survie du patient quelque soit le type de tumeur primaire. Un des mécanismes largement décrit comme impliqué dans la formation des métastases est la Transition Epithélio-Mésenchymateuse puisque ce mécanisme permettrait la ré-acquisition par des cellules épithéliales différenciées des propriétés de cellules mésenchymateuses conduisant à une augmentation de la mobilité et de l'auto-renouvellement cellulaire aboutissant à la dissémination des cellules cancéreuses ayant subi la TEM dans l'organisme. Le rôle de l'autophagie au cours de la TEM, au regard du rôle de l'autophagie au cours de la carcinogenèse, est complexe. Ce lien étroit entre autophagie et TEM sera détaillé dans la partie III.5. TEM et autophagie.

1. Gènes de l'autophagie et cancer

La découverte du rôle de l'autophagie au cours de la carcinogénèse a été mise en évidence grâce à l'étude de l'expression des gènes de l'autophagie dans le cancer. En effet, certaines études avaient montré une diminution de l'expression des gènes de l'autophagie dans certains cancers suggérant tout d'abord un rôle de l'autophagie comme mécanisme suppresseur de tumeur. Toutefois, par la suite, d'autres études avaient plutôt décrit une augmentation de l'expression de ces gènes. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que l'autophagie pouvait avoir un double rôle au cours de la carcinogenèse dépendant du contexte cellulaire ou encore du type de tumeur.

1.1. Diminution de l'expression des gènes de l'autophagie

C'est grâce à la découverte de l'implication de BECLIN1 (protéine du complexe PI3KC3-C1 impliqué dans l'initiation de l'autophagie) dans la progression tumorale en 1999 par le groupe de Levine

et collaborateurs, qu'il a été suggéré que l'autophagie était impliquée dans le cancer. Il avait été préalablement montré que le gène *BECLIN1* est localisé sur une région chromosomique 17q21 fréquemment délétée dans les cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate (Aita et al., 1999). L'étude de l'expression de la protéine BECLIN1 dans des tissus de cancer de sein humain a permis de montrer que BECLIN1 était faiblement exprimée dans ces tissus comparativement aux tissus sains. L'étude du rôle de BECLIN1 dans la lignée MCF-7 de cancer du sein a permis de mettre en évidence que les cellules avec une forte expression de BECLIN1 conduisait à une augmentation de l'autophagie associée à une inhibition de la prolifération, de la clonogénécité ainsi que de la croissance tumorale *in vivo* (Liang et al., 1999). De manière similaire, il a été décrit que BECLIN1 était faiblement exprimé dans des tissus de cancers gastriques (Yu et al., 2016), de cancer du foie (Daniel et al., 2007) ou encore des cancers cervicaux (Wang et al., 2007) comparativement aux tissus sains adjacents et que cette faible expression était également associée avec la formation de métastases ganglionnaires dans le cas de cancers gastriques (Yu et al., 2016). Toutefois, d'autres études ont permis de mettre en évidence que *BECLIN1* pouvait être surexprimé dans le cas de cancers gastriques et pouvait être utilisé comme marqueur de mauvais pronostic (Qu et al., 2017).

De manière similaire, il a été décrit que le gène *UVRAG* (ultraviolet irradiation resistance associated gene), également impliqué dans la régulation de l'initiation de l'autophagie et codant pour la protéine UVRAG faisant partie du complexe PI3KC3-C2 impliqué dans la maturation de l'autophagosome, était fréquemment muté de manière mono-allélique dans les cancers du côlon. L'étude du rôle de UVRAG dans la lignée HCT116 de cancer de colon humain a permis de mettre en évidence que la faible expression de *UVRAG* était associée à une déficience en autophagie et que la surexpression de *UVRAG* permettait de restaurer l'autophagie et était associée à une diminution de la prolifération et de la croissance tumorale *in vivo* (Liang et al., 2006).

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude d'autres gènes de l'autophagie dans la progression tumorale. Par exemple, il a également été décrit une forte diminution de l'expression de *ATG5* dans les cancers colorectaux et que cette diminution était associée à l'invasion des cellules (Cho et al., 2012). Tous ces résultats suggèrent un rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie. Pourtant d'autres études mettent en évidence qu'une augmentation de l'expression des gènes de l'autophagie serait associée à la carcinogénèse.

1.2. Surexpression des gènes de l'autophagie

La protéine *AMBRA1* (Activating molecule in BECLIN1-regulated autophagy) permet l'activation de BECLIN1 et donc de l'autophagie. Il a été montré que *AMBRA1* est surexprimée dans de nombreux cancers (adénocarcinome canalaire pancréatique, cholangiocarcinome, cancer de la prostate,

adénocarcinome gastrique, mélanome cutané et cancer du sein), était généralement décrit comme de mauvais pronostic et était associé à la progression tumorale (Falasca et al., 2015; He et al., 2018; Ko et al., 2013; Nitta et al., 2014; Qu et al., 2017; Tang et al., 2016).

De manière similaire, il a été décrit que la protéine ATG7 était surexprimée dans environ 66% des cas de cancer de la vessie comparativement aux tissus sains (Zhu et al., 2017) et que cette augmentation était associée à la croissance tumorale et l'invasion dans certains cancers (Li et al., 2013; Santanam et al., 2016; Takamura et al., 2011).

Il a été également décrit que le gène *p62* est surexprimé dans certains cancers (les lymphomes à larges cellules B, les carcinomes hépatocellulaires, les adénocarcinomes pancréatiques, les mélanomes cutanés, ou encore les cancers du thymus) comparativement aux tissus sains et que cette surexpression est associée à une mauvaise survie. Toutefois, il a été également décrit que l'expression de *p62* est plus importante dans les leucémies aiguës que dans les cellules saines et que la localisation de la protéine p62 est cytoplasmique plutôt que nucléaire pouvait être un marqueur pour les étapes précoces de la carcinogenèse (Zhu et al., 2018).

L'étude de l'expression des différents gènes de l'autophagie au cours de la carcinogenèse a permis de mettre en évidence un double rôle de l'autophagie. Ce double rôle est expliqué par l'implication de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire lors des étapes précoces et par le rôle de l'autophagie dans la survie des cellules en condition de stress lors des étapes plus tardives de la carcinogenèse.

2. Rôles de l'autophagie dans la progression tumorale

2.1. Rôle anti-tumoral de l'autophagie

Il apparaît que l'autophagie aurait un rôle suppresseur de tumeur dans les étapes plutôt précoces de la progression tumorale. Premièrement, c'est un mécanisme qui permet d'inhiber la transformation cellulaire grâce au maintien de la stabilité génomique par son implication dans la dégradation des ERO et des rétrotransposons ARN mais également par son implication dans la sénescence ou la mort induite par les oncogènes.

2.1.1 *Autophagie, oncogènes et transformation cellulaire*

La transformation cellulaire est due à la survenue de mutations au niveau de gènes spécifiques impliqués dans la prolifération cellulaire et le maintien des capacités d'auto-renouvellement appelés des proto-oncogènes. Suite à ces mutations, les proto-oncogènes deviennent des oncogènes conduisant au cancer.

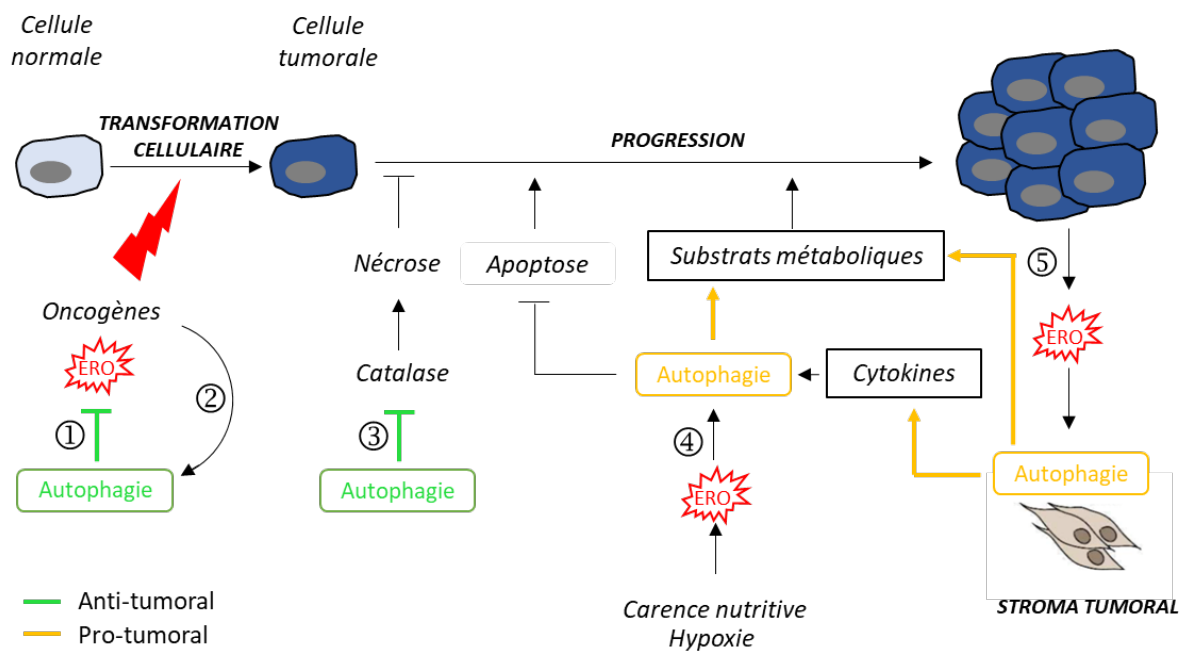


Figure 8 : Rôles pro- et anti-tumoraux de l'autophagie dans le cancer

L'autophagie a été majoritairement décrite comme ayant un rôle suppresseur de tumeur lors des étapes précoces de la carcinogenèse. ① L'autophagie permet la diminution du stress oxydatif et la dégradation d'oncogènes inhibant ainsi la transformation cellulaire. De plus, ② la dérégulation des oncogènes cellulaires peut également conduire à l'activation de la mort par autophagie. ③ L'autophagie a également été décrite comme impliquée dans la dégradation de la catalase impliquée dans la mort par nécrose conduisant ainsi à la survie des cellules tumorales.

Plus tardivement, ④ l'autophagie est un mécanisme permettant la survie des cellules tumorales. Premièrement, elle permet la survie des cellules en condition de carence nutritionnelle et d'hypoxie en fournissant des substrats énergétiques aux cellules ainsi qu'en inhibant la mort par apoptose. Finalement, ⑤ les ERO relarguées par les cellules tumorales vont induire l'autophagie des cellules du stroma permettant premièrement, de fournir des substrats métaboliques pour subvenir aux besoins des cellules tumorales mais permettant également la sécrétion de cytokines impliquées dans la prolifération des cellules tumorales et dans l'induction de l'autophagie protumorale des cellules tumorales.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'apparition de mutations au niveau de l'ADN peut être due à une augmentation intracellulaire des ERO due à une hypoxie, un dysfonctionnement mitochondrial ou encore une accumulation des protéines mal repliées. L'autophagie étant impliquée dans l'élimination de ces sources d'ERO contribue au maintien de la stabilité génomique (Murray et al., 2018). En effet, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules primaires épithéliales de souris conduit à une sensibilité des cellules aux stress conduisant à une augmentation des mutations, de l'instabilité chromosomique aboutissant à une accélération de l'établissement de l'aneuploïdie caractéristiques de la progression tumorale (Guang et al., 2019; Mathew et al., 2007). De plus, lors de l'étude de plusieurs modèles murins déficients pour l'autophagie, il a été observé une accélération de l'oncogenèse. Initialement, il a été décrit chez des souris que la délétion monoallélique de *BECLIN1* et que l'inactivation d'*ATG7* dans les cellules du foie, conduisaient au développement spontané de tumeurs (lymphome ou encore carcinome du foie)(Liang et al., 1999; Mortensen et al., 2011; Qu et al., 2003; Takamura et al., 2011; Yue et al., 2003). L'autophagie permet également le maintien de la stabilité génomique par son implication dans la dégradation des rétrotransposons ARN (Guo et al., 2014). L'insertion de

rétrotransposons dans le génome conduit à la diversité génétique mais serait également impliquée dans le cancer comme décrit dans le cas de l'insertion de rétrotransposons dans le gène APC (Adenomatous polyposis coli) dans le cancer du côlon (Miki et al., 1992).

L'autophagie permet également de prévenir l'accumulation d'oncoprotéines telles que les protéines de fusion PML-RAR bloquant la différenciation myéloïde dans la LAM3 (Leucémie aigüe myéloblastique 3) et BCR-ABL1 ayant une activation constitutive de son activité kinase dans la LMC (Leucémie myéloïde chronique)(Goussetis et al., 2012; Isakson et al., 2010) diminuant l'agressivité de ces cellules. De manière similaire l'autophagie a été décrite comme permettant l'élimination des protéines RhoA (Ras Homolog Family Member A) inhibant ainsi la prolifération et la survie des cellules ainsi que la transformation induite par l'oncogène RAS (Belaid et al., 2013; Qiu et al., 1995).

2.1.2 *Autophagie et morts cellulaires*

L'autophagie, en plus d'être un mécanisme de survie en réponse à des stress environnementaux, est également décrite comme une mort de type II et apparaît comme une voie alternative à la mort de type I par apoptose. De plus, l'autophagie est un mécanisme en lien étroit avec les différents types de morts cellulaires telles que la nécrose ou la sénescence mais également avec l'apoptose.

Comme décrit précédemment, l'activation d'oncogènes cellulaires peut conduire à la mort par apoptose mais également par autophagie (Elgendy et al., 2011). En effet, lors d'un défaut de l'apoptose, l'inhibition de l'autophagie conduit à une diminution de la mort cellulaire (Shimizu et al., 2004). La mort par autophagie est un mécanisme qui intervient lors d'un stress cellulaire important dépassant un « seuil » conduisant à une dégradation trop importante de matériel cellulaire causant ainsi des troubles irréversibles au sein de la cellule induisant ainsi sa mort (Maiuri et al., 2007).

L'autophagie est également impliquée dans la mort par nécrose. En effet, il a été décrit qu'une enzyme clef de la régulation du mécanisme de nécrose, la catalase, était dégradée par autophagie. La diminution du taux de catalase intracellulaire conduit à une accumulation sévère de ERO conduisant à l'oxydation des lipides membranaires aboutissant à une perte de l'intégrité membranaire et donc à sa mort par nécrose (Yu et al., 2006). Bien que le lien entre autophagie et sénescence ne soit à ce jour que peu documenté, il a été décrit que la surexpression de ATG5 augmentait l'activité de SA- β -Gal (Senescence-associated β -galactosidase) impliquée dans l'induction de la sénescence dans des cellules de mélanome et que l'inactivation génétique d'ATG5 conduisait à une diminution de la sénescence induite par l'oncogène Braf (Liu et al., 2013a).

Malgré le fait que l'autophagie apparaisse comme un mécanisme suppresseur de tumeur lors des étapes précoces de la carcinogenèse, une fois la tumeur établie, l'autophagie serait majoritairement impliquée dans la promotion tumorale.

2.2. Rôle pro-tumoral de l'autophagie

L'autophagie aurait également un rôle pro-tumoral par son implication dans le maintien du métabolisme cellulaire dans des conditions de carence nutritive ou encore d'hypoxie. L'autophagie permettrait également la survie des cellules en dormance et serait impliquée dans l'inhibition de l'apoptose. De plus, les cellules du microenvironnement seraient également impliquées dans la régulation de la progression tumorale. L'autophagie dans ces cellules contribuerait à fournir des substrats métaboliques aux cellules tumorales adjacentes entretenant ainsi leur survie (Figure 8).

2.2.1 Autophagie, carence nutritive et hypoxie

Le manque de nutriments ainsi que l'hypoxie sont des conditions généralement retrouvées au sein du microenvironnement tumoral et permettent l'induction de la mort des cellules par apoptose. Toutefois, un défaut de l'apoptose est souvent retrouvé dans ces cellules et les rend ainsi très agressives. Le stress métabolique retrouvé au niveau de la tumeur est dû au fait que celle-ci croît rapidement mais que l'angiogenèse qui permettra sa vascularisation est un mécanisme plus tardif. Dans ces conditions, c'est le recyclage par autophagie qui va permettre un apport en nutriments induisant la survie des cellules tumorales expliquant que le niveau d'autophagie soit généralement très élevé dans ces cellules.

Initialement, il a été décrit chez la levure que l'autophagie permet de préserver le taux d'acides aminés en réponse à une carence nutritive (Suzuki et al., 2011) puis que la délétion de *ATG5* chez des souris conduit à leur mort précocement après la naissance du fait d'un manque d'ATP et d'acides aminés (Kuma et al., 2004). Ces résultats suggèrent un rôle de l'autophagie dans le maintien des substrats métaboliques et donc du niveau énergétique de la cellule. En effet, l'inhibition de l'autophagie conduit à une diminution de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* dans des cellules cancéreuses de colon et de pancréas (Weinberg et al., 2010; Yang et al., 2011). Afin de subvenir aux besoins métaboliques cellulaires, il a été décrit que l'autophagie permet de fournir des substrats métaboliques au cycle de Krebs tel que des acides aminés ou encore de l'acétyl-CoA grâce à la lipophagie permettant le maintien du métabolisme mitochondrial (Singh et al., 2009). De plus, il apparaît que l'autophagie et en particulier la mitophagie serait impliquée dans la croissance tumorale par son implication dans le maintien de la qualité mitochondriale et donc des oxydations phosphorylantes, source d'énergie pour la croissance et la prolifération des cellules.

2.2.2 *L'autophagie permet la survie des cellules en dormance*

Une des causes des rechutes suite au traitement d'un cancer est la résistance de certaines cellules tumorales qui vont survivre pendant plusieurs mois voire plusieurs années en état de dormance. C'est suite au « réveil » de ces cellules et donc suite à la reprise de la prolifération cellulaire qu'intervient la rechute. Un des mécanismes permettant la survie de ces cellules en dormance est l'autophagie. En effet, l'inhibition génétique ou chimique de l'autophagie dans des cellules de cancer du sein humain en dormance conduit à une diminution de leur survie *in vitro* et *in vivo*. En revanche, l'autophagie ne serait plus nécessaire une fois les cellules ayant retrouvé un état prolifératif (Vera-Ramirez et al., 2018).

2.2.3 *L'autophagie inhibe l'apoptose*

Bien que le lien entre l'autophagie et l'apoptose soit complexe et que l'autophagie soit également décrite comme facilitant l'apoptose par la dégradation de facteur de survie tel que la cavéoline ou encore par son rôle dans l'activation de la caspase 8 (Chen et al., 2018; Jin et al., 2009), l'autophagie serait majoritairement décrite comme un mécanisme inhibiteur de l'apoptose (Boland et al., 2018; Fouillet et al., 2012; Mollereau et al., 2016; Ravikumar et al., 2006). Initialement, comme nous l'avons déjà mentionné, l'autophagie permet l'élimination des mitochondries endommagées réduisant le stress oxydatif des cellules inhibant ainsi leur mort par apoptose. De plus l'autophagie permet la dégradation de la caspase 3 impliquée dans l'induction de l'apoptose tel que décrit dans les neurones (Yang et al., 2008a).

L'autophagie serait également impliquée dans l'inhibition d'un type d'apoptose appelée l'anoïkis intervenant lors du détachement d'une cellule de la matrice extracellulaire. L'inhibition de l'anoïkis est impliquée dans la formation des métastases en induisant la survie des cellules tumorales circulantes. En effet, il a été décrit que le détachement des cellules de la matrice extracellulaire conduit à l'induction de l'autophagie et que l'inhibition génétique de l'autophagie par interférence ARN siATG5 et siATG7 conduit à une augmentation du clivage de la caspase-3 et donc à la mort cellulaire par apoptose dans ces cellules (Fung et al., 2008).

2.2.4 *Autophagie et maintien des propriétés de cellules souches*

L'auto-renouvellement cellulaire est une des caractéristiques des cellules pluripotentes qui peuvent donner tous les types cellulaires d'un organisme. Une des caractéristiques des cellules tumorales est la ré-acquisition de cette capacité conduisant ainsi à l'agressivité tumorale. Il a été décrit que l'autophagie basale est impliquée dans le maintien de ce renouvellement cellulaire puisqu'une inhibition de l'autophagie par délétion de *ATG5* ou *ATG7* dans des cellules pluripotentes de carcinome embryonnaire humain diminue leur prolifération et leur viabilité en diminuant l'expression des facteurs

de pluripotence POU5F1 (POU Class 5 Homeobox 1), SOX2 (SRV-Box Transcription Factor 2) et NANOG (Sharif et al., 2017).

2.2.5 *Autophagie et stroma tumoral*

Une tumeur est entourée par des cellules non cancéreuses appartenant à différents types cellulaires (cellules immunitaires, fibroblastes ou encore de cellules endothéliales) composant ainsi le stroma tumoral impliqué dans la création et le maintien du microenvironnement tumoral et dans la croissance tumorale. En effet, il a été décrit dès 1975 que les cellules du microenvironnement tumoral mammaire peuvent conduire à une réversion de la nature maligne de cellules tumorales de sein en induisant leur différenciation (DeCosse et al., 1975) et que le stroma tumoral est également impliqué dans la résistance aux chimiothérapies chez des patients atteints de cancer du sein (Andre et al., 2010).

Le rôle des cellules du stroma tumoral lors de la croissance tumorale implique leur capacité à sécréter des facteurs anti-apoptotiques, à contribuer à la vascularisation de la tumeur par la sécrétion d'EGF (Epithelial growth factor) et de promouvoir la mobilité cellulaire par la sécrétion de chémokines ou encore de métalloprotéases, d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale par la sécrétion de cytokines mais également de fournir des substrats métaboliques aux cellules tumorales. L'autophagie dans les cellules du stroma tumoral est généralement moins élevée que dans les cellules tumorales. Toutefois, l'autophagie dans ces cellules serait impliquée dans la sécrétion de certains facteurs et substrats métaboliques permettant la croissance tumorale. En effet, les cellules tumorales sécrètent des ERO dans le microenvironnement conduisant à l'activation de l'autophagie et de la glycolyse dans les fibroblastes du stroma tumoral appelés CAF (Cancer-associated fibroblastes) et une augmentation de la prolifération des cellules tumorales lors de l'étude de cellules de cancer colorectales CRC (Colorectal cancer cells)(Zhou et al., 2016). De manière similaire, dans le cas de cancer squameux de la tête et du cou HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma), l'autophagie des CAF est également impliquée dans la progression tumorale. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie des CAF diminue la prolifération des cellules cancéreuses CRC et HNSCC (New et al., 2017; Zhou et al., 2016)(Figure 8).

Initialement, l'autophagie des CAF permet la production de nutriments tels que les corps cétoniques pour alimenter les cellules tumorales (Pavlidis et al., 2010, 2012). De plus, l'autophagie des CAF est impliquée dans la sécrétion de facteurs tels que IL-6 (Interleukine-6) ou encore IL-8 (Interleukine-8). L'inhibition de l'autophagie diminue la sécrétion de ces facteurs par les CAF et ainsi la prolifération des cellules tumorales (New et al., 2017). D'autres facteurs peuvent être sécrétés par l'autophagie par les CAF telles que les cytokine IGF-1 (Insulin-like growth factor), IGF-2 et CXCL-12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12) permettant la survie des cellules de mélanome A375M et de cancer du poumon A549 après radiothérapie en induisant l'autophagie dans ces cellules (Wang et al., 2017).

Ces observations sur le rôle de l'autophagie des cellules du stroma tumoral favorisant la progression tumorale suggèrent que l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules serait une bonne stratégie pour inhiber la croissance tumorale. En effet, lors de l'ajout d'inhibiteur de l'autophagie telle que la rapamycine dans le milieu de culture de cellules tumorales co-cultivées avec des CAF, une diminution de la prolifération cellulaire est observée (Mercier et al., 2012; Zhou et al., 2016). De manière similaire, il a été décrit que l'autophagie des CAF est impliquée dans la résistance aux chimiothérapies. En effet, l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules conduit à une augmentation de l'effet anti-prolifératif des chimiothérapies dans le cas des cellules de cancer du pancréas (Zhang et al., 2018b) ainsi que dans le cas de leucémie lymphoïde chronique et conduit également à une diminution de la résistance aux traitements des cellules cancéreuses (Ding et al., 2018).

2.3. Autophagie et thérapeutiques antitumorales

Comme nous l'avons vu précédemment, l'autophagie a un rôle majeur dans la progression tumorale. C'est pourquoi cibler l'autophagie pourrait être une stratégie permettant la mort des cellules tumorales. En effet, l'activation de l'autophagie conduisant à la mort par autophagie ou l'inhibition de l'autophagie conduisant à la mort par apoptose sont des stratégies utilisées en thérapeutique. De plus, lors de l'utilisation de thérapies anticancéreuses, il apparaît souvent une résistance aux traitements du fait de la dérégulation de l'autophagie par le traitement. De ce fait activer ou inhiber l'autophagie en combinaison avec le traitement pourrait permettre d'augmenter son efficacité. Il en résulte ainsi deux stratégies conduisant à l'élimination des cellules tumorales : utiliser un inhibiteur de l'autophagie conduisant à une sensibilisation des cellules au traitement ou utiliser un inducteur de l'autophagie conduisant à la mort par autophagie. Moduler l'autophagie est ainsi un mécanisme de première importance dans le traitement des cancers. A ce jour, de nombreuses études sur la modulation de l'autophagie dans différents types de cancer sont en cours d'essais cliniques (Clinicaltrials.gov).

2.3.1 Inhiber l'autophagie pour inhiber son rôle cytoprotecteur

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'autophagie possède un rôle cytoprotecteur et permet une réponse aux stress environnementaux. Dans ce cas, inhiber l'autophagie peut être une stratégie pour conduire à la mort cellulaire. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur de l'autophagie HCQ (hydroxychloroquine) est utilisée en essais clinique de phase I dans le traitement des cancers du sein ER+ (Estrogen receptor positive) et en essais clinique de phase II dans le traitement des cancers de la prostate (Bishop and Bradshaw, 2018). Toutefois, les inhibiteurs de l'autophagie sont généralement utilisés en combinaison avec d'autres molécules de chimiothérapie. En effet, l'utilisation de chimiothérapies induit généralement un grand stress cellulaire qui peut ainsi être contré par l'autophagie conduisant ainsi à une résistance des cellules tumorales à la mort. C'est pourquoi, HCQ est

couramment utilisée dans de nombreux essais cliniques en combinaison avec des chimiothérapies anticancéreuses (cancer colorectal, adénocarcinome, cancer rénal, cancer pancréatique...)(Chude and Amaravadi, 2017; Onorati et al., 2018). De manière similaire, dans le cas du traitement du cancer du sein ER+ par le tamoxifène il apparaît dans de nombreux cas une résistance au traitement due à l'induction de l'autophagie dans ces cellules. L'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie (3-Méthyladénine ou Bafilomycine A1) permet ainsi de sensibiliser les cellules au tamoxifène (Medina et al., 2009).

2.3.2 Activer l'autophagie pour activer la mort par autophagie

L'autophagie est également un mécanisme de mort cellulaire et ainsi induire une forte autophagie peut également apparaître comme une stratégie permettant l'induction de la mort par autophagie des cellules cancéreuses. En effet, différents traitements ciblés permettent la mort des cellules tumorales par autophagie tel que décrit dans le cas de l'utilisation de l'arsenic trioxyde (inducteur de l'apoptose), de l'Imatinib (inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase) dans des cellules de gliome humaines (Kanzawa et al., 2003; Shingu et al., 2009) ou dans le cas de l'utilisation de BO-1051 (alkylant de l'ADN) dans le cas de cancers oraux (Lo et al., 2012). Toutefois, les inducteurs de l'autophagie sont généralement utilisés en combinaison avec d'autres traitements anticancéreux. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur de MTOR, la rapamycine ou de dérivés de la rapamycine, en combinaison à la radiothérapie conduit à une augmentation de la mort des cellules de cancer du sein (Albert et al., 2006), de la prostate (Cao et al., 2006) ainsi que de carcinomes hépatocellulaires (Kuwahara et al., 2011).

L'étude de l'expression de gènes de l'autophagie, tels que les gènes ATG8, peut également permettre d'établir un pronostic dans certains cancers. L'expression des gènes ATG8 sera détaillée dans la partie II.3 ATG8 et cancer.

3. ATG8 et cancer

3.1. Les protéines ATG8

Les protéines ATG8 sont des protéines conservées au cours de l'évolution avec un membre ATG8 chez la levure, deux membres LGG-1 (orthologue de la famille GABARAP) et LGG-2 (orthologue de la famille LC3) chez C-Elegans (Chen et al., 2017) puis 8 membres chez les mammifères. Comme nous l'avons déjà dit, chez ces derniers, la famille de protéines ATG8 est composée de 2 sous-familles : les protéines de la sous-famille GABARAP avec 3 membres (GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2) et les protéines de la sous-famille LC3 avec 5 membres (LC3A α , LC3A β , LC3B, LC3B2 et LC3C).

3.1.1 La sous-famille GABARAP

2.1.1.3 Généralités

La famille GABARAP possède un fort pourcentage d'identité au niveau nucléotidique, protéique et aussi structurel (Figure 5)(Le Grand et al., 2011). Au niveau nucléotidique les gènes *GABARAP*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* sont composés de quatre exons chacun et sont localisés sur les chromosomes 17, 12 et 16 respectivement (Xin et al., 2001). Au niveau protéique, *GABARAP*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* sont des ubiquitine like proteins composées de 117 acides aminés permettant la formation de deux hélices α en position N-terminale, d'un feuillet β en position C-terminale avec une structure centrale semblable à celle de l'ubiquitine (Coyle et al., 2002)(Figure 5).

2.1.1.4 Découverte de la sous-famille GABARAP

GABARAPL1 a été initialement identifié dans notre laboratoire en 1993 comme un nouveau gène régulé par les œstrogènes chez le cochon d'inde et avait été nommé *GEC1* (glandular epithelial cells 1). L'ARNm de *GEC1* est composé de 1800 bases et son expression est augmentée d'un facteur 2 suite au traitement par des œstrogènes pendant 2h. A cette date, le séquençage de ce nouveau gène n'avait révélé aucune similarité avec d'autres gènes déjà caractérisés (Pellerin et al., 1993).

En 1998, Legesse-Miller et al. en s'intéressant aux transports intra-Golgien dans le cerveau bovin identifient p16, une protéine de 16 kDa impliquée dans les processus de fusion et d'amarrage (Legesse-Miller et al., 1998). Puis, le clonage de p16 et l'étude des mécanismes de transport intra-Golgien a permis de démontrer son interaction avec NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) permettant d'augmenter son activité ATPase et avec des protéines SNARE impliquées dans les processus de transport vésiculaire et avait été ainsi renommée GATE16 (Golgi associated ATPase enhancer of 16 kDa). Par la suite, GATE16 a été identifiée comme une protéine ayant un fort pourcentage d'homologie de séquence protéique avec *GABARAP* et LC3 (Sagiv et al., 2000).

En 1999, Wang et al. identifient *GABARAP* comme une protéine de liaison entre les microtubules et la sous unité $\gamma 2$ du récepteur $GABA_A$ dans des cellules nerveuses de rat (Wang et al., 1999). En 2001, *GEC1* de cobaye est entièrement séquencé et l'analyse de la séquence fait apparaître 100% d'identité avec *GEC1* humain et 87% d'identité avec la partie codante de *GABARAP* humain alors que les régions UTR3' (Untranslated region 3') de *GEC1* et de *GABARAP* humains sont très différentes. De plus, il a été décrit que les protéines codées par ces gènes possèdent en N-terminal un motif de liaison à la tubuline suggérant que ces protéines soient des protéines MAP (Microtubule-associated protein)(Vernier-Magnin et al., 2001).

En 2001, Xin et al. montrent que l'ADNc de GEC1 correspond à l'ADNc de GABARAPL1, que l'ADNc de GATE16 est identique à celui de GABARAPL2 et que ce sont des homologues de GABARAP. Ainsi, les gènes *GABARAP*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* ont été décrits comme appartenant à la même sous-famille GABARAP (Xin et al., 2001). Il a également été décrit que ces gènes sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus humains (Xin et al., 2001) avec *GABARAP* fortement exprimé dans les glandes endocrines, *GABARAPL1* dans le système nerveux central (Nemos et al., 2003) et *GABARAPL2* dans les organes sécréteurs et le système nerveux central (Sagiv et al., 2000).

2.1.1.5 Rôles des protéines de la sous-famille GABARAP

Comme nous venons de le voir, *GABARAP*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* sont des protéines MAP (Mansuy et al., 2004) et sont impliquées dans le transport du NSF (Chen and Olsen, 2007) et du récepteur aux κ -opioïdes et permettent d'augmenter leur nombre au niveau de la membrane cellulaire (Chen et al., 2011). *GABARAP* et *GABARAPL1*, quant à elles, ont été décrites comme impliquées dans le transport du récepteur GABA_A (Mansuy et al., 2004; Wang et al., 1999) et AT1 (Angiotensin receptor type 1)(Cook et al., 2008).

Enfin, comme nous l'avons déjà dit, les protéines de la sous-famille GABARAP sont impliquées dans le processus d'autophagie. En effet, l'homologue ATG8 chez la levure avait été identifié comme impliqué dans le processus d'autophagie (Lang et al., 1998) et son homologie avec les protéines de la sous-famille GABARAP chez les mammifères suggère leur implication dans le processus d'autophagie (voir I.2), ce qui a été confirmé par la découverte de leur localisation au niveau de la membrane des autophagosomes (Chakrama et al., 2010; Kabeya et al., 2004).

3.1.2 La sous-famille LC3

2.1.1.6 Généralités

Les protéines de la sous-famille LC3 ont été initialement identifiées en 1994. Puis, par comparaison de séquences, il a été montré que les membres de la sous-famille GABARAP avaient un fort pourcentage d'identité avec les protéines LC3 (31-42%), bien que celui-ci soit moindre comparativement aux protéines GABARAP entre elles (58-87%)(Figure 5). Les gènes *LC3A* composés de 6 exons, *LC3B* et *LC3C* composés de 4 exons sont localisés sur les chromosomes 20, 16 et 1 respectivement. Ils codent pour les protéines LC3A α et LC3A β , LC3B, LC3B2 et LC3C qui sont composées de 121 et 125, 125 et 147 acides aminés respectivement.

2.1.1.7 Découverte des protéines de la sous-famille LC3

Initialement, les protéines LC3 ont été identifiées comme interagissant avec les protéines associées aux microtubules neuronaux MAP1A et MAP1B (Microtubule-associated protein)(Mann and

Hammarback, 1994a). Elles sont abondantes dans le cerveau et dans les testicules mais faiblement exprimées dans les autres tissus (Mann and Hammarback, 1994a). Puis, ce sont les travaux de He et collaborateurs qui ont permis l'identification de trois gènes MAP1LC3 LC3A, LC3B et LC3C. Enfin, il a été décrit que l'ARNm LC3A pouvait subir un épissage alternatif donnant ainsi lieu à deux protéines LC3A α et LC3A β (He et al., 2003).

LC3A et LC3B sont exprimés dans le cœur, le cerveau, les muscles squelettiques et les testicules alors que d'autres cellules telles que les leucocytes du sang périphérique n'expriment que LC3B. Enfin, LC3C est exprimé à un niveau plus faible que les autres membres dans tous les tissus (He et al., 2003).

2.1.1.8 Rôles des protéines de la sous-famille LC3

De même que pour les protéines GABARAP, l'homologie de séquence protéique entre ATG8 chez la levure et LC3 chez les mammifères a suggéré un rôle de ces protéines dans l'autophagie (voir 1.2). Les protéines LC3 ont été identifiées comme localisées au niveau des autophagosomes chez les mammifères (Kabeya et al., 2000; Lang et al., 1998) et ces protéines ont été également décrites comme possédant un domaine de liaison à la tubuline (He et al., 2003; Kouno et al., 2005).

Les protéines LC3 sont aussi impliquées dans un processus de trafic intracellulaire appelé la LAP (LC3-associated phagocytosis). La LAP est un mécanisme de dégradation qui consiste à prendre des récepteurs tels que les TLR (Toll like receptor) au niveau de la membrane plasmique dans des vésicules à simple membrane pour conduire à leur dégradation par autophagie (Sanjuan et al., 2007). Le processus de LAP est impliqué dans la présentation d'antigènes exogènes par les cellules dendritiques et donc impliqué dans la réponse immunitaire (Blanchet et al., 2010; Münz, 2011). Les protéines de la sous-famille GABARAP n'ont quant à elle pas été décrites comme impliquées dans la LAP. Toutefois, récemment et de manière similaire à la LAP, il a été montré que GABARAP est impliquée dans la régulation du taux cellulaire du récepteur Fn14 (Fibroblast growth factor-inducible 14) et que GABARAPL2 est impliquée dans sa dégradation par autophagie (Winer et al., 2018).

3.2. Implication des protéines ATG8 dans le cancer

L'expression et le rôle des protéines ATG8 dans les cancers sont peu décrits et sont complexes. Toutefois, il semblerait que dans certains cancers, l'expression de ces protéines, et en particulier des protéines GABARAP soit diminuée. En revanche l'expression des protéines LC3 est souvent étudiée comme marqueur de l'autophagie et non comme marqueur de carcinogenèse en tant que tel.

3.2.1 Les protéines ATG8, fonction suppresseur de tumeur et marqueurs de bon pronostic

2.1.1.1 Expression des ATG8 et phénotypes cancéreux

Les protéines de la sous-famille GABARAP ont été majoritairement décrites comme de bon pronostic dans les cancers hématopoïétiques, rénaux, de la prostate, du sein, ainsi que du foie (Berthier et al., 2010; Brigger et al., 2013a; Hervouet et al., 2015; Liu et al., 2014; Roberts et al., 2004; Su et al., 2016; Uhlen et al., 2017). De manière similaire, l'expression des protéines LC3 a été décrite comme diminuée dans les cancers de la prostate, des poumons, de la thyroïde, des cervicales et des ovaires (Hu et al., 2015; Jiang et al., 2012; Li et al., 2015; Liu et al., 2013b; Shen et al., 2008). Pour plus de détails voir **(Revue I)**.

La diminution de l'expression des membres de la famille ATG8 au cours de la carcinogenèse a été associée à des régulations épigénétiques ou encore à l'activation constitutive de certaines voies de signalisation cellulaire. En effet, il a été décrit que dans la lignée MCF-7, le promoteur de *GABARAPL1* est hyperméthylé et l'histone H3 désacétylée conduisant à la fermeture de la chromatine (Hervouet et al., 2015). De plus, dans les cellules HeLa, il a été décrit que l'expression de *LC3*, *GABARAPL1* et *GABARAPL2* sont diminuées du fait de l'augmentation de l'expression de la méthyltransférase G9a généralement impliquée dans la répression transcriptionnelle (Artal-Martinez de Narvajás et al., 2013). En revanche, dans le cas du cancer de la prostate, il a plutôt été décrit que la diminution de l'expression de *GABARAPL1* est due à l'activation constitutive de la voie Akt conduisant à l'inactivation des facteurs de transcription FoxOs.

Afin d'étudier le rôle suppresseur de tumeur des protéines ATG8, des études ont été réalisées dans plusieurs modèles cellulaires de cancer du sein MCF-7, de cancer du foie HepG2 et HepG3 et de cancer de la prostate LNCaP. Ces études ont permis de montrer que *GABARAPL1* est impliquée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'invasion ainsi que la croissance tumorale (Berthier et al., 2010; Poillet-Perez et al., 2017; Su et al., 2016; Zhang et al., 2011). De manière similaire, le rôle de GABARAP a été étudié dans un modèle de cancers de l'ovaire et du sein où il a été décrit que l'inactivation de GABARAP conduit à une augmentation de la viabilité cellulaire, la migration et la prolifération (Rho et al., 2013). En revanche, à ce jour, le rôle de *GABARAPL2* ou encore des protéines LC3 dans la progression tumorale n'a pas été étudié. Toutefois, LC3B induit une atténuation de la sénescence induite par les oncogènes dans un modèle HEK293 (Dou et al., 2015).

2.1.1.2 Les protéines ATG8 permettent une dégradation sélective d'oncogènes

Le rôle suppresseur de tumeur des protéines ATG8 a été décrit comme majoritairement lié à leur implication dans la dégradation sélective d'oncogènes cellulaires (Boyer-Guittaut et al., 2014; Islam et al., 2018; Zhang et al., 2011). Tout d'abord, l'accumulation de mitochondries conduit à la formation de ERO et une réorganisation du cytosquelette induisant une augmentation de l'agressivité cellulaire (Boyer-Guittaut et al., 2014; Rodger et al., 2018; Schwarten et al., 2009; Takamura et al., 2011). De plus, l'accumulation de p62 a été décrit comme impliquée dans la modulation du métabolisme du glucose conduisant à la promotion de la carcinogenèse comme décrit dans de nombreux cancers (foie, gastrique, sein et prostate)(Rodger et al., 2018). p62 est recrutée par les protéines ATG8 et est dégradée par autophagie sélective. Ces résultats suggèrent que les protéines ATG8 permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire et inhibe ainsi la carcinogenèse. De manière similaire, les fonctions suppresseurs de tumeur de GABARAP et de GABARAPL1 sont liées à leur implication dans la dégradation sélective de Dvl 2 (Dishvelled 2) conduisant à une inhibition de la voie de signalisation Wnt (Wingless-integration 1 pathway) et donc de la croissance tumorale des carcinomes hépatocellulaires (Zhang et al., 2011). De plus, les fonctions suppresseurs de tumeur de LC3B sont également dues à leur implication dans la dégradation de la Lamine B1. En effet, un défaut de la dégradation de la Lamine B1 (Dou et al., 2015) conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de la sénescence (Shimi et al., 2011). Les protéines LC3A, LC3C et GABARAP pourraient également être impliquées dans cette dégradation puisqu'elles peuvent également interagir la Lamine B1 (Dou et al., 2015). De plus, l'autophagie sélective a également été décrite comme permettant la dégradation des facteurs de transcription SNAI1 et TWIST impliqués dans la régulation de la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) conduisant ainsi à une diminution de l'agressivité des cellules cancéreuses (Grassi et al., 2015; Zada et al., 2019). Le rôle des protéines ATG8 au cours de la TEM sera décrit dans la partie III.5. TEM et Autophagie.

En plus de permettre la dégradation d'oncogènes cellulaires, les protéines ATG8 pourraient être impliquées dans la régulation de voies de signalisation. En effet, GABARAP est impliquée dans l'augmentation de l'expression de p53 conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire diminuant la viabilité cellulaire, la migration ainsi que la prolifération dans des modèles de cancers de l'ovaire et du sein (Rho et al., 2013). GABARAP est également impliquée dans la régulation de la voie PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase)/Akt inhibant l'angiogenèse et la croissance tumorale dans un modèle de cancer de l'ovaire (Park et al., 2014).

3.2.2 Les protéines ATG8, oncogènes cellulaires et marqueurs de mauvais pronostic

Le rôle des protéines ATG8 au cours de la carcinogenèse semble dépendant du type de tumeur ainsi que du contexte cellulaire. En effet, il a été également décrit que les membres de la famille GABARAP sont surexprimés dans certains cancers (thyroïde, colorectal, tête et cou) et apparaissant comme des marqueurs d'une mauvaise survie (Keulers et al., 2015; Miao et al., 2010; Roberts et al., 2004; Uhlen et al., 2017). De façon similaire, l'expression de LC3 semble augmentée dans de nombreux cas (les cancers gastro-intestinaux, dans les cancers du sein triples négatifs, dans les cancers du foie ainsi que de l'œsophage)(Chen et al., 2013; Lefort et al., 2014; Wu et al., 2014; Yoshioka et al., 2008). L'étude plus précise du membre LC3B a permis de mettre en évidence que son expression est généralement plus élevée dans les métastases comparativement à la tumeur du sein primaire, dans les cancers du foie ainsi que les mélanomes (Lazova et al., 2012; Peng et al., 2013a, 2013b).

Initialement, l'inactivation de GABARAPL1 a été décrite comme induisant une diminution de la prolifération cellulaire, l'invasion, l'apoptose, la croissance tumorale ainsi que la formation des métastases *in vivo* (Ran et al., 2017). Les protéines LC3 ont quant à elle été décrites comme impliquées dans la régulation de voie de signalisation. En effet, LC3 permet *via* une interaction LC3-ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 2) à la surface de l'autophagosome facilitant la phosphorylation de ERK, l'induction de la voie de signalisation Raf-MEK-ERK (Martinez-Lopez et al., 2013). Ainsi, une augmentation de LC3 pourrait être impliquée dans une suractivation de cette voie décrite comme impliquée dans de nombreux cancers (rein, foie, poumon, thyroïde ou encore lors de mélanomes)(Gollob et al., 2006). De plus, le rôle des protéines ATG8 et en particulier des protéines GABARAP pourrait impliquer leur rôle dans le trafic cellulaire. En effet, une augmentation de GABARAP pourrait conduire à une augmentation du récepteur GABA_A (Chen et al., 2011) décrit comme impliqué dans le cancer de la prostate (Takehara et al., 2007).

Pour conclure, les membres de la sous-famille GABARAP ont généralement une expression diminuée dans les cancers et sont généralement décrits comme des gènes suppresseurs de tumeurs impliquant leur rôle dans la dégradation sélective d'oncogènes cellulaires. En revanche, l'expression des protéines LC3 semble dépendante du type de tumeur et est rarement corrélée avec le pronostic et serait plutôt utilisée afin d'étudier le flux autophagique dans les cellules cancéreuses. Le rôle des protéines ATG8 lors de la promotion de la croissance tumorale n'est à ce jour que faiblement documentée.

III. TEM –autophagie

1. TEM & cancer

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse ou TEM est un mécanisme dynamique de transition phénotypique de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses nécessitant des modifications architecturales et fonctionnelles complexes aboutissant à la perte des caractéristiques épithéliales et l'acquisition des caractéristiques mésenchymateuses. C'est un mécanisme réversible par la Transition Mésenchymato-Epithéliale (Figure 9). La TEM peut être induite par de nombreux stress cellulaires mais également par des cytokines tel que le TGF β conduisant ainsi à l'activation de facteurs de transcription associés à la TEM (EMT-TFs) tels que SNAI1, TWIST et ZEB (Zinc finger E-box binding protein) permettant l'inhibition des gènes épithéliaux et l'activation des gènes mésenchymateux cibles.

Les cellules de type épithéliales sont des cellules qui établissent des contacts avec les cellules voisines et qui reposent sur une lame basale par la mise en place de jonctions intercellulaires (des jonctions d'adhérence, des desmosomes et des jonctions serrées) et de jonctions cellules-lame basale (point de contact focaux et hémidesmosomes). Cette organisation confère aux cellules un axe de polarité apico-basal permettant la formation d'un tissu ayant un rôle de barrière mais aussi d'absorption par la mise en place d'une organisation spécifique des organites intracellulaires. Les cellules épithéliales possèdent une faible capacité de mobilité leur permettant uniquement de se déplacer au sein de leur couche cellulaire d'appartenance au sein d'un tissu. De manière opposée, les cellules de type mésenchymateux ne présentent pas de polarisation, elles ne reposent pas sur une lame basale et les rares contacts intercellulaires interviennent *via* de simples points de contacts focaux. Ce sont des cellules qui adoptent une morphologie allongée de type fibroblastique. Les rôles de ce type de cellules sont un rôle de tissu de soutien et un rôle nutritif des tissus épithéliaux. Ces cellules possèdent quant à elles d'importantes capacité de mobilité grâce à leur très grande plasticité leur permettant même de franchir la matrice extracellulaire.

La TEM peut intervenir dans plusieurs cas. Tout d'abord la TEM de type I intervient au cours de l'embryogenèse et la formation des tissus. La TEM de type II quant à elle intervient lors de la cicatrisation cellulaire ou encore la régénération de tissus. Pour finir, la TEM de type III, que j'ai étudié au cours de ma thèse, est caractéristique d'un développement pathologique telle que lors de la fibrose ou encore dans le cadre de la progression tumorale. La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale due à des modifications génétiques ou épigénétiques affectant généralement des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs est impliquée dans la régulation de l'expansion clonale cellulaire, le développement de tumeurs mais aussi dans la TEM. Les cellules tumorales ayant subi la TEM peuvent ainsi envahir et générer des métastases induisant la progression du cancer mettant généralement en jeu le pronostic vital du patient (Kalluri and Weinberg, 2009).

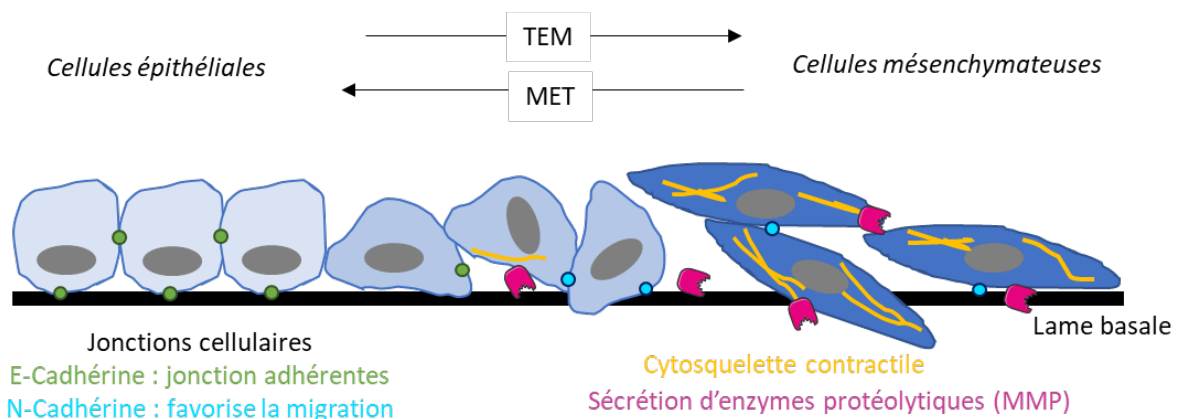


Figure 9 : Représentation schématique de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse

Les cellules de type épithéliale possèdent de nombreuses jonctions entre elles et avec la lame basale leur permettant une organisation tissulaire. Au cours de la TEM, ces cellules perdent ces structures, adoptent une forme allongée de type fibroblastique et acquièrent des propriétés telles que la mise en place de structures impliquées dans la mobilité cellulaire et la sécrétion d'enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la lame basale et ainsi son franchissement par les cellules. Au cours de la Transition Mésenchymato-Épithéliale (TME), les cellules subissent les modifications inverses.

La TEM est donc un processus très documenté dans le cadre d'étude des cellules cancéreuses *in vitro*. Toutefois, il y a encore peu de temps, l'implication de la TEM dans la carcinogénèse et particulièrement dans la formation des métastases restait un sujet en débat à cause du manque de preuves évidentes de son implication dans des échantillons cliniques et de la grande difficulté à l'étudier du fait que les cellules mésenchymateuses individuelles se détachent de la masse tumorale et ressemblent à des fibroblastes du stroma tumoral et du fait du caractère transitoire et réversible de ce mécanisme. Aujourd'hui, l'implication de la TEM dans le caractère invasif des cellules semble acquis au vu des nombreuses observations au niveau du front invasif de tumeurs solides qui montrent que ces cellules ont une diminution de l'expression de la E-Cadhérine, marqueur épithélial, et une augmentation de la Vimentine, marqueur mésenchymateux. De plus, il existe une corrélation entre l'expression de SNAI1, un facteur de transcription de la TEM, avec la survie et la rechute des patients indiquant l'implication de la TEM dans les résultats cliniques (Thiery et al., 2009). En plus de son implication dans la formation des métastases, la TEM serait également impliquée dans la mise en place d'échappement du système immunitaire, dans la mise en place des caractéristiques de cellules souches cancéreuses ainsi que dans la résistance aux thérapies anticancéreuses.

1.1. Découverte de l'implication de la TEM dans la carcinogénèse

L'implication de la TEM dans la progression tumorale a tout d'abord été mise en évidence dans les années 90 dans le cas de cancer du sein. En effet, il a été initialement observé que les lignées cellulaires de cancer du sein possédant des propriétés d'invasion *in vitro* et *in vivo* avaient une forte expression de la Vimentine, composant des filaments intermédiaires (Thompson et al., 1992). Par la suite, il a été également décrit une diminution des composants des complexes d'adhérence cellule-

cellule telle que la E-Cadhérine (Sommers et al., 1994). De plus, la diminution de l'expression de la E-Cadhérine est souvent accompagnée d'une augmentation de l'expression de la N-Cadhérine et la forte expression de la N-Cadhérine a été décrite comme corrélée à une augmentation de la mobilité cellulaire (Nieman et al., 1999). La N-Cadhérine et la Vimentine étant des marqueurs de la TEM, ces observations mettent en lumière que la TEM serait impliquée dans l'invasion cellulaire des cellules du cancer du sein.

1.2. TEM et formation des métastases

La formation des métastases est une des premières causes de mortalité des patients atteints de cancer c'est pourquoi l'inhibition de ce mécanisme serait un élément clef dans le traitement des cancers. La formation des métastases est un processus multi-étape : i) les cellules de la tumeur primaire envahissent localement le tissu, ii) rejoignent la circulation (intravasation), iii) ont la capacité de survivre au cours de leur dissémination, iv) rejoignent un tissu secondaire (extravasation), puis v) le colonise. Un des mécanismes qui permettrait ce processus serait la TEM puisqu'elle a été décrite comme impliquée dans la plupart de ces étapes.

Tout d'abord les étapes i) d'envahissement d'un tissu, puis ii) d'intravasation sont permises grâce à l'acquisition de capacité de migration et d'invasion par les cellules. Un des mécanismes impliqué dans l'acquisition de ces capacités est la diminution de l'expression des molécules d'adhérence telle que la E-Cadhérine réprimée par SNAI1 (Cano et al., 2000; Sommers et al., 1994). Plus tard, d'autres études ont révélé des rôles similaires d'autres facteurs de transcription de la TEM (EMT-TF) SNAI2, ZEB ou encore TWIST dans la migration cellulaire (Bolós et al., 2003; Yang et al., 2004). Les capacités d'invasion cellulaire au cours de la TEM sont également permises grâce à la sécrétion de métalloprotéases par les cellules tumorales permettant la dégradation de la matrice extracellulaire facilitant l'invasion des cellules (Nabeshima et al., 2002). En effet, il a été décrit que la surexpression de SNAI1 permettait une augmentation de l'expression des métalloprotéases MMP (Matrix metalloproteinase) : MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MT1-MMP (Membrane-type matrix metalloproteinases) et MT2-MMP (Jordà et al., 2005; Miyoshi et al., 2004; Ota et al., 2009; Yokoyama et al., 2003). MT1-MMP et MT2-MMP sont impliquées dans la perforation de la lame basale *in vivo* et permettent la prolifération et l'intravasation des cellules cancéreuses (Hotary et al., 2006).

Comme décrit précédemment, la survie des cellules lors de la dissémination par la circulation sanguine iii) serait quant à elle majoritairement permise grâce à l'autophagie. Dans ces conditions, l'autophagie permet d'une part l'inhibition de l'anoïkis, mort induite lors d'une perte de l'adhérence cellulaire (Fung et al., 2008), et d'autre part le maintien du métabolisme cellulaire des cellules circulantes.

L'étude du rôle de la TEM dans l'extravasation iv) est un challenge puisque lors d'études *in vivo*, les cellules tumorales sont généralement injectées en grande quantité dans la circulation sanguine. Ces cellules arrivent ainsi au niveau des vaisseaux pulmonaires entraînant généralement une croissance tumorale dans les vaisseaux plutôt que dans les tissus pulmonaires expliquant la difficulté de l'étude de l'extravasation. Toutefois, des études sur le poisson zèbre, modèle permettant facilement l'étude des mouvements cellulaires, ont pu mettre en évidence l'implication de TWIST dans l'extravasation des cellules cancéreuses de sein. TWIST permettrait la mise en place de différentes structures impliquées dans la déformation cellulaire permettant aux cellules tumorales de pénétrer l'endothélium (Stoletov et al., 2010). La mise en place de ces structures intervient grâce à des changements morphologiques impliquant une réorganisation du cytosquelette dans laquelle les facteurs de transcription de la TEM ont été décrits comme impliqués (Shibue et al., 2012).

Lors de la colonisation du site tumoral secondaire v), il a plutôt été suggéré qu'une réversion de la TEM est nécessaire (MET). En effet, des cellules non induites en TEM, des cellules induites et maintenues en TEM ou de cellules induites en TEM mais dont la TEM est réversible ont été injectées à des souris. Il a été montré que l'induction de la TEM est impliquée dans l'extravasation des cellules. Lors de l'injection des cellules en TEM réversible plus de métastases sont formées que lors de l'injection des cellules en TEM irréversible (Tsai et al., 2012). La réversion de la TEM serait donc nécessaire pour la formation des métastases. Ceci est expliqué par le fait que la TEM inhibe la prolifération cellulaire ainsi une réversion de la TEM permet de lever cette inhibition et permet donc aux cellules de proliférer. En effet, SNAI1, ZEB et les SMAD, autres facteurs de transcription de la TEM, ont été décrits comme inhibant le cycle cellulaire (Dijke et al., 2002; Mejlvang et al., 2007; Vega et al., 2004) et TWIST comme inhibant la prolifération cellulaire (Tsai et al., 2012).

Malgré ces nombreuses observations, deux études récentes réfutent l'implication de la TEM dans la formation des métastases. Une première étude a décrit que l'inactivation de SNAIL ou TWIST ne diminue pas la formation des métastases dans le cadre de cellules cancéreuses pancréatiques PDAC suggérant qu'un autre mécanisme que la TEM soit impliqué. En revanche, comme généralement décrits dans d'autres études, Zheng et Collaborateurs, ont montré que l'inactivation de la TEM conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire, une augmentation de l'expression de transporteurs aux nucléosides augmentant la sensibilité des cellules aux traitements gemcitabine et à une survie augmentée des souris (Zheng et al., 2015). De manière similaire, la seconde étude réalisée dans un modèle de cancer de poumon a montré également que la TEM ne serait pas impliquée dans la formation des métastases mais dans la résistance aux traitements (Fischer et al., 2015).

Malgré ces deux études récentes, la majorité de celles réalisées sur l'implication de la TEM dans la formation des métastases montrent que la TEM aurait bien un rôle dans la dissémination des cellules

cancéreuses primaires vers un site secondaire. De plus, il a été décrit que la TEM serait également impliquée dans l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire.

1.3. TEM et échappement du système immunitaire

La TEM serait également impliquée dans l'échappement de la réponse antitumorale du système immunitaire. En effet, il a été décrit que la surexpression de SNAI1 dans des cellules MCF-7 conduit à une diminution de la mort cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ce mécanisme pourrait mettre en jeu l'activation du processus d'autophagie permettant la survie de ces cellules (Akalay et al., 2013). L'induction de la TEM conduit également à une augmentation de PD-L1 qui participe à la résistance de la mort induite par les CTL (Noman et al., 2014). De plus, afin de conduire à la mort par cytotoxicité, les cellules du système immunitaire, les cellules T ou encore les Natural killers (NK), doivent interagir avec les cellules tumorales par le biais de la synapse immunologique. La TEM est impliquée dans une diminution de la reconnaissance des cellules tumorales par ces cellules conduisant à une altération de la mise en place des synapses immunologiques et à une diminution de la mort des cellules tumorales induite par le système immunitaire (Terry et al., 2017). De plus, les cellules mésenchymateuses sécrètent des facteurs permettant le maintien de la TEM tel que le TGF β décrit comme inhibant la maturation, la différenciation ainsi que l'activation des cellules du système immunitaire (Joffroy et al., 2010; Takai et al., 2013; Thomas and Massagué, 2005).

1.4. TEM, CSC et résistance aux thérapies

Nous avons vu précédemment que l'une des caractéristiques des cellules tumorales augmentant l'agressivité était la résistance de ces cellules aux thérapies. Si l'autophagie a été décrite précédemment comme pouvant être impliquée dans cette résistance majoritairement par son implication dans l'élimination des stress cellulaires induits par le traitement, il apparaît que la TEM soit également impliquée, ce qui pourrait mettre en jeu son rôle dans l'acquisition de caractéristiques de cellules souches cancéreuses (CSC).

Il a été décrit que l'expression des facteurs de transcription de la TEM était corrélée avec un mauvais pronostic, l'agressivité, les métastases et la résistance aux chimiothérapies. En effet, l'expression de SNAI1 et de ZEB est impliquée dans la résistance au cisplatine, au 5-fluorouracile, au gefitinib ou encore au doxorubicine (Arumugam et al., 2009; Chang et al., 2011; Haslehurst et al., 2012; Hsu et al., 2010; Tryndyak et al., 2010; Witta et al., 2006; Zhang et al., 2012).

Bien que la TEM ait été initialement décrite comme impliquée dans la résistance aux traitements du fait de son implication dans la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme, un autre challenge lors du traitement des cancers est dû à l'hétérogénéité des cellules tumorales (Singh and

Settleman, 2010). En effet, malgré leur origine clonale, les cellules tumorales subissent des mutations et par l'induction de la TEM, certaines acquièrent des capacités de cellules souches permettant de générer des cellules cancéreuses phénotypiquement différentes (Pardal et al., 2003). Il a été décrit que l'induction de la TEM était impliquée dans l'acquisition des caractéristiques CSC après traitement au TGF β de cellules mammaires ou de poumon (Mani et al., 2008; Pirozzi et al., 2011) ou lors de l'activation des voies Ras/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) de cellules mammaires (Morel et al., 2008). De manière similaire, il a été décrit que l'inactivation du gène de la β -caténine, facteur de transcription impliqué dans l'induction de la TEM, inhibe l'acquisition des caractéristiques de cellules souches cancéreuses dans le cas de cellules cancéreuses cutanées (Malanchi et al., 2008). De nombreuses autres connexions entre TEM et CSC ont été décrites dans plusieurs cas de cancers (prostate, pancréas, tête et cou ou encore colon)(Shibue and Weinberg, 2017). Ces capacités de résistances des cellules souches cancéreuses aux thérapies impliquent la forte expression de facteurs anti-apoptotiques, une augmentation du taux des transporteurs d'efflux ainsi que la faible prolifération de ces cellules (Dean et al., 2005; Feuerhake et al., 2000; Peters et al., 1998; Zhou et al., 2001).

Du fait de son implication dans la carcinogénèse la TEM est un processus actuellement ciblé dans les thérapies anticancéreuses dans de nombreux types de cancers (mélanomes, cancer du poumon, cancer du sein, glioblastomes, cancer colorectal...)(Cho et al., 2019).

2. Les voies d'induction de la TEM

Au sein d'une tumeur de nombreux facteurs solubles sont sécrétés par les cellules tumorales et les cellules du stroma tumoral tel que le TGF β (Transforming growth factor β). Le TGF β permet l'induction de la voie dite canonique SMAD et des voies dites non SMAD aboutissant à la régulation des acteurs de la TEM. En plus du TGF β , d'autres stimuli peuvent permettre l'induction de la TEM : les voies WNT, Notch ainsi que les facteurs de croissance mettant en jeu les récepteurs tyrosine kinase (Figure 10).

2.1. La voie classique du TGF β_1

Dans le cancer, le rôle du TGF β_1 est généralement décrit comme suppresseur de tumeur lors des stades précoces et pro-tumoral lors des stades plus tardifs. Ces rôles différentiels sont largement décrits dans de nombreuses revues (Bierie and Moses, 2006a, 2006b; Hata et al., 1998; Massagué, 2008; Siegel and Massagué, 2003; Tsubakihara and Moustakas, 2018). Lors de la progression tumorale, le TGF β_1 est une cytokine retrouvée dans le plasma de patients atteints de cancer ainsi qu'au niveau de la tumeur et est corrélé avec un mauvais pronostic (Dalal et al., 1993). Cette forte concentration en TGF β_1 peut être expliquée par le fait que de nombreuses cellules immunitaires sont recrutées au niveau de la tumeur tels que les macrophages infiltrant la tumeur, les cellules dendritiques ou encore les cellules T

du fait d'un environnement riche en cytokines. Ce sont ces cellules immunitaires infiltrant la tumeur qui vont sécréter le $TGF\beta_1$ induisant ainsi la création d'un microenvironnement tumoral riche en $TGF\beta_1$ permettant l'induction de la TEM des cellules tumorales. En plus d'induire la TEM des cellules tumorales, le $TGF\beta_1$ aurait un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale ainsi que dans l'angiogenèse en favorisant la production de facteurs de croissances angiogéniques tel que le VEGF (Vascular endothelium growth factor)(ten Dijke and Arthur, 2007; Fuxe and Karlsson, 2012). Ces conditions favorisent ainsi la formation des métastases.

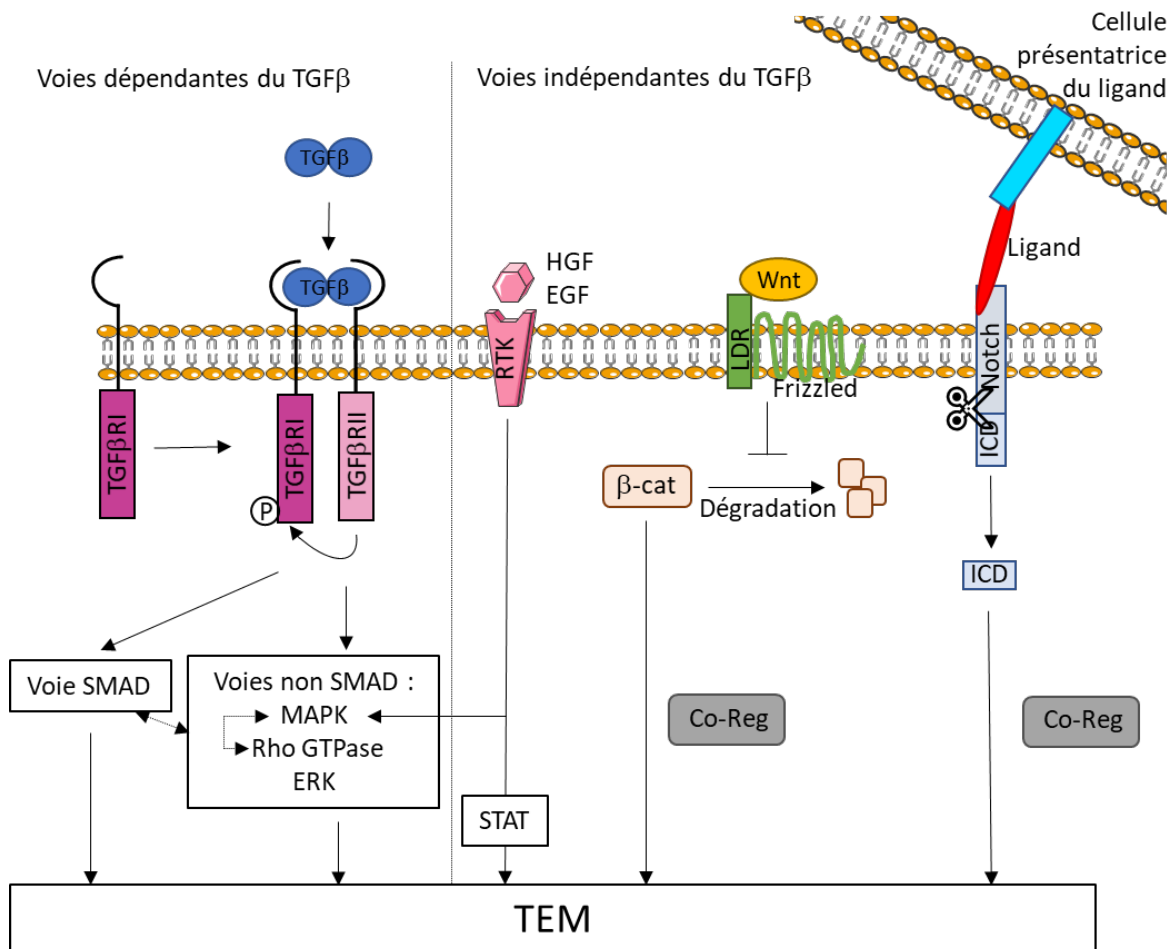


Figure 10: Les différentes voies d'induction de la TEM

Il existe plusieurs voies d'induction de la TEM : Les voies dépendantes du $TGF\beta$ et les voies indépendantes du $TGF\beta$. Les voies dépendantes du $TGF\beta$ sont activées suite à la fixation du $TGF\beta$ sur son récepteur activant ainsi la voie SMAD ou les voies non SMAD telles que les voies MAP kinase, Rho GTPase ou encore ERK aboutissant à la TEM. D'autres voies de signalisation indépendantes du $TGF\beta$ peuvent également conduire à la TEM : l'activation des voies tyrosine kinase (RTK), la voie Wnt ou encore la voie Notch.

2.1.1 Le $TGF\beta_1$ et ses récepteurs

Le $TGF\beta_1$ appartient à une grande famille de polypeptides sécrétés par les cellules et impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la différenciation ou encore la migration au cours du développement mais aussi lors de pathologies (Moustakas and Heldin, 2009). Chez les mammifères, même si d'autres membres de la grande famille du $TGF\beta$,

composée d'environ 40 ligands sécrétés, sont impliqués dans l'induction de la TEM, nous allons ici principalement étudier le TGF β ₁ puisque c'est l'isoforme majoritairement sécrété par le système immunitaire (Li et al., 2006) et lors des études *in vitro* le TGF β ₁ est majoritairement utilisé. Il sera par la suite appelé TGF β .

Les récepteurs au TGF β sont des glycoprotéines composées d'un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire mais aussi d'un domaine kinase intracellulaire permettant la transduction du signal. Le TGF β possède une forte affinité pour le TGF β RII (TGF β receptor II) et se lie au niveau de son domaine extracellulaire. En revanche il ne semble pas interagir avec le TGF β RI (Massagué, 1998) mais sa liaison sur le TGF β RII permet le recrutement et l'activation du TGF β RI formant ainsi un complexe moléculaire composé de quatre récepteurs et d'un dimère de ligands (Franzén et al., 1993; Laiho et al., 1991; Vander Ark et al., 2018).

L'activation du TGF β RI permet l'induction de différentes voies de signalisation pouvant aboutir à la TEM. Tout d'abord, de la voie SMAD qui est la voie dite « classique » d'induction de la TEM mais aussi des voies non SMAD.

2.1.2 La voie canonique SMAD dépendante du TGF β

Il existe plusieurs types de protéines SMAD : les R-SMADs (Receptor-regulated SMAD) activées suite à la fixation du TGF β sur son récepteur, les Co-SMAD (Common mediator SMAD) qui sont les médiateurs et les I-SMAD (Inhibitory SMAD) sont les SMAD inhibiteurs (Figure 11).

Suite à l'activation du TGF β RI, les protéines R-SMADs (SMAD2 et SMAD3) sont recrutées par la protéine SARA (SMAD anchor for receptor activation) permettant ainsi leur phosphorylation en C-terminal et la formation d'un homo- ou d'un hétéro-dimère (Kawabata et al., 1998). Leur phosphorylation permet le recrutement du Co-SMAD (SMAD4) et c'est le complexe qui sera transloqué dans le noyau (Souchelnytskyi et al., 1997). En absence de la fixation du TGF β sur son récepteur les protéines R-SMAD résident majoritairement dans le cytoplasme. Leur translocation nucléaire nécessite donc la formation de complexes protéiques et est dépendante de la séquence d'adressage au noyau NLS (nuclear localization sequence) présente dans le domaine N-terminal de SMAD3 (Xiao et al., 2000).

Suite à sa translocation nucléaire, le complexe protéique va interagir avec l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles. Les protéines SMAD3 et SMAD4 mais pas SMAD2 ont la capacité d'interagir directement avec l'ADN au niveau de séquences SBE (SMAD-binding element). Ces séquences ont été retrouvées au niveau de nombreux promoteurs de gènes impliqués dans la réponse au TGF β (Dennler et al., 1998, 1999). Toutefois, l'activité transcriptionnelle des protéines SMAD nécessitent l'intervention de co-activateurs et de co-répresseurs ainsi que des interactions avec d'autres facteurs

de transcription permettant ainsi la régulation de l'expression de gènes cibles tels que *SNAI1* (Itoh et al., 2000).

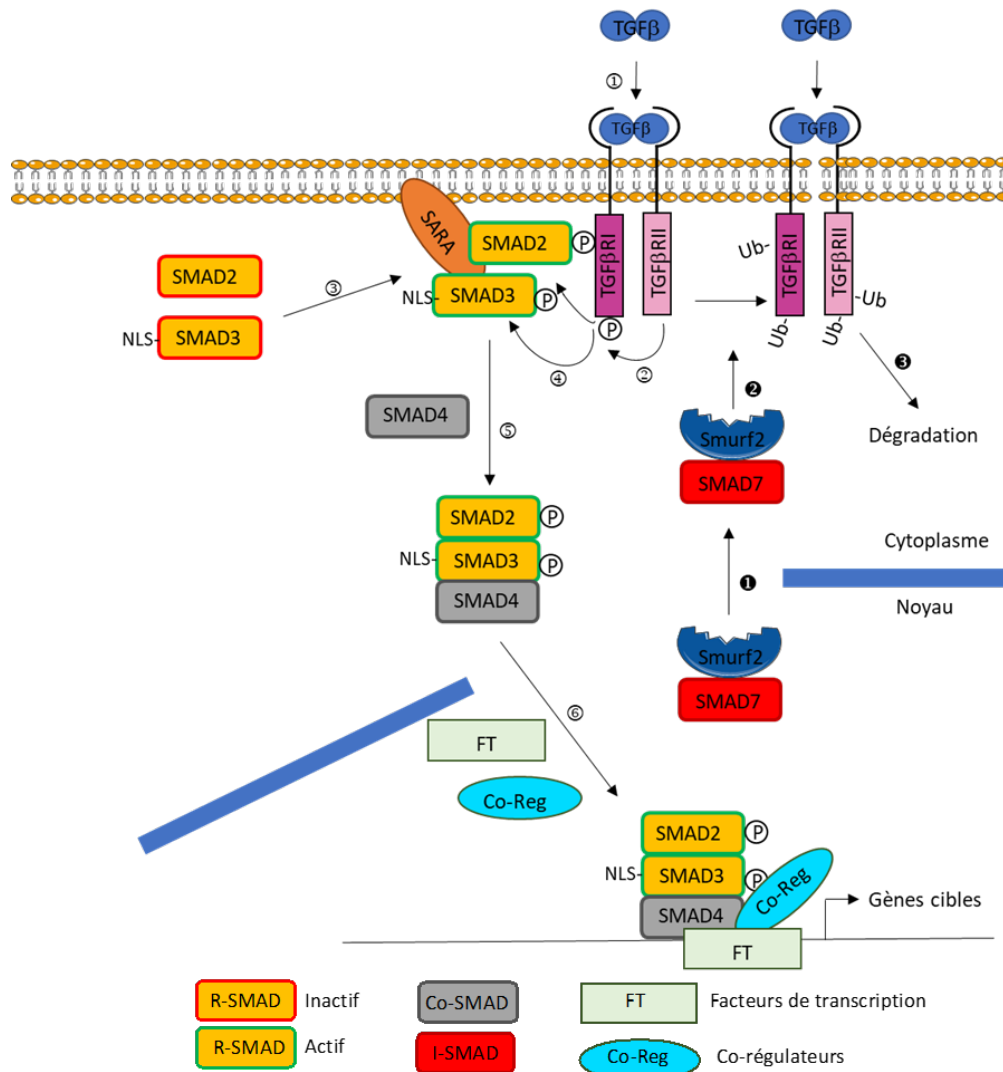


Figure 11 : Voie SMAD

① Le TGFβ se fixe sur le récepteur TGFβRII induisant ② le recrutement du récepteur TGFβRI et son activation par phosphorylation. ③ Les protéines inactives SMAD2 et SMAD3 sont recrutées à proximité du TGFβRI par la protéine SARA permettant ainsi ④ leur phosphorylation par le TGFβRI. ⑤ Les protéines p-SMAD2, p-SMAD3 et SMAD4 vont ainsi former un trimère qui va être ⑥ transloqué au niveau du noyau grâce à la séquence NLS de SMAD3. Suite au recrutement de co-régulateurs et d'autres facteurs de transcription s'en suit une régulation des gènes cibles. Une boucle de rétro-contrôle permet la régulation de cette voie (① - ③). Suite à la fixation du TGFβ, ① le complexe SMAD7-Smurf2 est exporté du noyau. Grâce à l'interaction de SMAD7 avec le TGFβRI, ② Smurf2 va l'ubiquitinyler conduisant ainsi ③ à sa dégradation et à l'arrêt du signal.

Un des mécanismes majoritairement impliqués dans la régulation de la voie SMAD sont les I-SMAD tels que SMAD7. SMAD7 est localisé dans le noyau où il forme un complexe avec l'ubiquitine ligase Smurf2 (SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2). Suite à la stimulation par le TGFβ, le complexe est transloqué au niveau du cytoplasme (Itoh et al., 1998) et SMAD7 peut ainsi se lier directement au TGFβRII activé permettant son ubiquitinylation par Smurf2 aboutissant ainsi à sa dégradation (Kavsak et al., 2000) et donc à l'arrêt du signal.

2.1.3 Les voies non SMAD dépendantes du TGFβ

La fixation du TGFβ sur son récepteur permet, en plus de l'activation des voies SMAD, l'activation de plusieurs autres voies dites non SMAD telles que les voies MAPK (p38, JNK et ERK), les voie Rho like GTPase (RhoA, Rac et Cdc42) ou encore la voie PI3K (Figures 10 et 12).

L'activation des voies MAP kinases intervient *via* des évènements de phosphorylation (Yue and

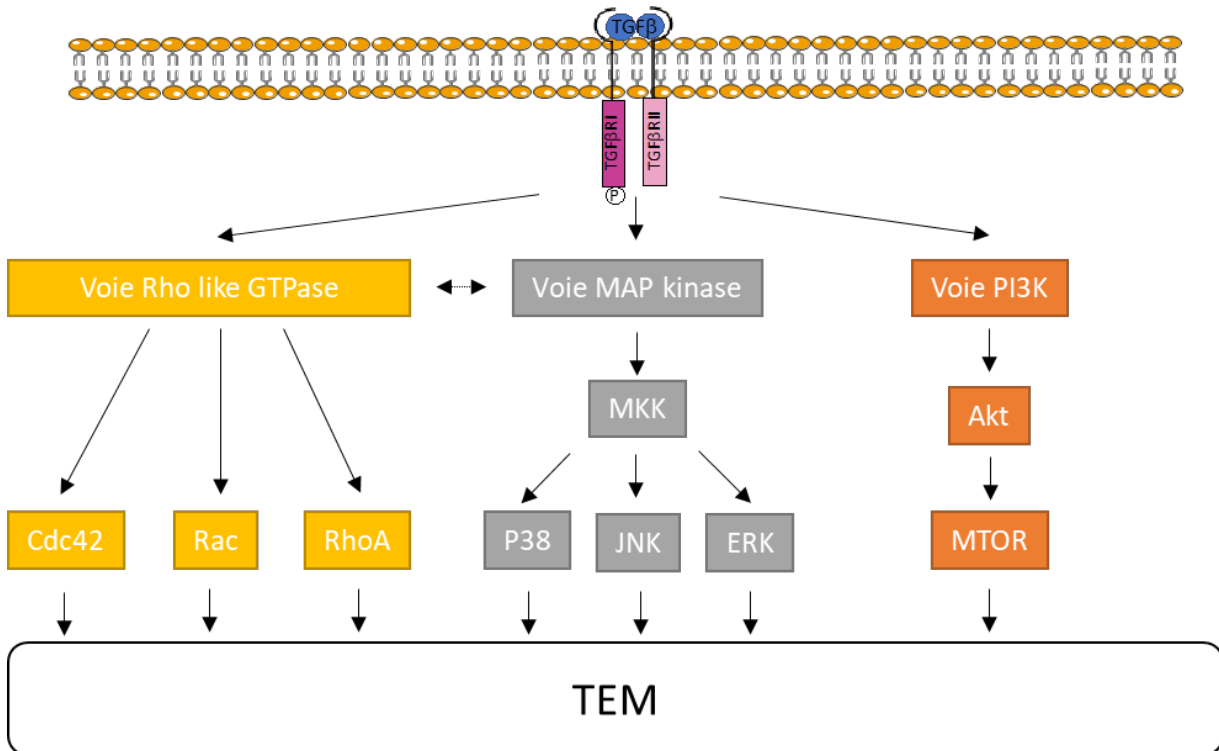


Figure 12: Voies non SMAD

La fixation du TGFβ sur son récepteur permet l'activation de nombreuses voies de signalisation dites non SMAD telle que les voies Rho like GTPase, PI3K ou encore MAP kinase. Ces voies peuvent être interconnectées entre elles et aboutissent à l'induction de la TEM tel que décrit pour les voies Rho like GTPase et MAP kinase.

Mulder, 2000). L'activation du récepteur au TGFβ induit l'activation des protéines MAPK à l'origine de l'activation des différentes voies MAPK p38, ERK et JNK. L'activation de la voie p38 kinase a été décrite comme une voie oncogénique aboutissant à l'acquisition d'un phénotype de cellules souches cancéreuses par l'inhibition de GATA3 (GATA binding protein 3) conduisant à la diminution du miR200b impliqué dans la répression transcriptionnelle de ZEB1 et ZEB2 impliqués dans la TEM (Tryndyak et al., 2010; Xu et al., 2018). L'activation de la voie ERK quant à elle conduit au dissolution des jonctions intercellulaires en favorisant leur endocytose inhibant le maintien de l'organisation tissulaire des cellules aboutissant également à la TEM (Zavadil et al., 2001; Zhang, 2009). Quant aux voies JNK, elles sont plutôt impliquées dans la maintenance du phénotype mésenchymateux des cellules par l'activation de la transcription de gènes mésenchymateux (ZEB1) et la répression de gènes épithéliaux (CDH1, codant pour la E-Cadhérine)(Sahu et al., 2015).

La voie du TGF β peut également induire les voies Rho-like GTPases RhoA, Rac et Cdc42 (Bhowmick et al., 2001) qui sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et particulièrement dans la mise en place des fibres d'actine contractiles impliquées dans la mobilité cellulaire mais aussi dans la dynamique des microtubules ainsi que dans l'assemblage des jonctions intercellulaires (Jaffe and Hall, 2005).

La voie PI3K est une autre voie de signalisation mise en jeu suite à une stimulation par le TGF β . Le TGF β R permet la phosphorylation de Akt. Cette voie aboutissant à la TEM met en jeu la protéine MTOR et est impliquée dans la réorganisation des filaments d'actine ainsi que l'augmentation de la taille cellulaire (Lamouille and Derynck, 2007).

L'ensemble de ces voies non SMAD semblent s'inter-réguler. Par exemple, les voies Rho like GTPase sont impliquées dans la régulation des voies MAPK (Bishop and Hall, 2000). Les voies non SMAD et les voies SMAD quant à elles peuvent être indépendantes. En effet, la voie RhoA n'est pas altérée lors de la surexpression d'un mutant dominant négatif de SMAD3 (Bhowmick et al., 2001). Toutefois, ces voies peuvent également s'interconnecter puisque la voie JNK peut conduire à l'activation de SMAD3 (Figure 10)(Mori et al., 2004).

2.1.4 Régulation de la voie du TGF β

Outre la régulation des différentes voies induites par le TGF β , la disponibilité en TGF β elle-même peut être régulée. Comme décrit précédemment, le TGF β peut être sécrété au niveau tumoral par les cellules immunitaires. Il est sécrété sous forme de complexe protéique latent pouvant interagir au niveau de la matrice extracellulaire pour une utilisation ultérieure nécessitant ainsi une étape d'activation. L'activation du TGF β peut se faire par de nombreuses protéases tels que la plasmine, MMP-2 ou encore MMP-9 (Annes et al., 2003) sécrétées par les cellules du système immunitaire (Fuxe and Karlsson, 2012) ainsi que par les cellules tumorales déjà en TEM ce qui permet le maintien de la TEM de ces cellules, inhibe la réponse immunitaire antitumorale et induit l'angiogénèse.

2.2. Autres voies d'induction de la TEM

Comme décrit précédemment, la TEM peut être induite par le TGF β suite à sa fixation sur son récepteur permettant l'activation des voies SMAD et non SMAD dépendantes du TGF β . Toutefois, il existe d'autres voies indépendantes du TGF β aboutissant à l'induction de la TEM : les voies Wnt, Notch ou encore récepteur RTK (récepteur tyrosine kinase)(Figure 10).

Wnt forme une grande famille de molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération, l'adhésion ou encore dans la mobilité cellulaire (Huelsenken and Birchmeier, 2001). La voie

la plus étudiée implique la fixation du ligand Wnt sur le récepteur Frizzled et le co-récepteur LDR (Low-density lipoprotein receptor-related protein) ce qui conduit à l'inactivation d'un complexe protéique impliqué dans la dégradation de la β -caténine. De ce fait, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau pour agir en tant que facteur de transcription *via* la formation de complexes avec les protéines de la famille des facteurs de transcription LEF (lymphocyte enhancer factor)/TCF (T cell factor) aboutissant à la destruction des jonctions intercellulaires et donc à la TEM (Das et al., 2019). De plus, l'activation de la voie Wnt conduit à la phosphorylation de SNAI1 induisant une diminution de la E-Cadhérine aboutissant à la TEM (Xu et al., 2010).

La voie Notch est activée suite à la fixation d'un ligand présenté par une cellule adjacente conduisant au clivage du récepteur libérant sa partie intracellulaire Notch ICD (Notch intracellular domain). Notch ICD est transloqué dans le noyau et *via* la collaboration avec des co-régulateurs aboutissant à l'expression de gènes cibles. Cette voie de signalisation conduit à l'acquisition de caractéristiques de cellules souches cancéreuses aboutissant à la TEM (Das et al., 2019).

La voie des récepteurs tyrosine kinase implique les récepteurs aux facteurs de croissance tels que HGF (hepatocyte growth factor), EGF (Epidermal growth factor) ou encore VEGF (Vascular epithelial growth factor) induisant l'activation de leurs récepteurs respectifs. Ces récepteurs ont une activité kinase intracellulaire qui par des cascades de phosphorylation peuvent conduire à l'activation des voies MAPK, des voies PI3K et des voies JAK (Janus kinase)/STAT (Signal transducer and activator of transcription) aboutissant à la TEM (Butti et al., 2018).

3. Les facteurs de transcription clefs de la TEM

Quelque-soit la voie d'induction de la TEM, l'aboutissement est généralement le même : la régulation de gènes cibles impliqués dans la TEM. Un premier niveau de régulation consiste en l'activation des facteurs de transcription de la TEM (EMT-FTs) tels que SNAI1, ZEB et TWIST. Ce sont ces facteurs de transcription qui vont permettre la répression des caractéristiques épithéliales telles que la E-Cadhérine et l'activation des caractéristiques mésenchymateuses telles que la N-Cadhérine.

Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la TEM sont classés en deux familles : les facteurs de transcription à doigts de zinc, famille à laquelle appartiennent ZEB (Zinc finger E-box binding protein) et SNAI1 et les facteurs de transcription bHLH (Basic helix loop helix), famille à laquelle appartient TWIST.

Au cours de ma thèse, j'ai principalement étudié le facteur de transcription SNAI1 puisque l'induction de la TEM par la voie du TGF β dans un modèle de cancer de poumon A549 conduisait à une très forte augmentation de son taux d'ARNm ainsi que de son taux protéique alors que le taux des ARNm de TWIST et ZEB n'était pas modifié.

3.1. Les facteurs de transcription SNAI1

La famille des facteurs de transcription SNAI1 est composée de trois membres SNAI1, SNAI2/SLUG et SNAI3/SMUC dont SNAI1 est le plus étudié. Ces facteurs de transcription possèdent au niveau C-terminal quatre à six motifs en doigts de zinc permettant leur fixation sur l'ADN au niveau de motif E-Box (5'-CANNTG-3') retrouvé dans le promoteur des gènes cibles, en N-terminal un domaine de fixation à de nombreux corépresseurs tels que des HDAC (Histone deacetylase) permettant la répression de gènes cibles et un domaine central contenant une séquence NES d'export du noyau ainsi qu'un domaine riche en sérine permettant une régulation de la localisation de ces protéines et de leur stabilité.

L'activité de SNAI1 est régulée au cours de la TEM par de nombreux signaux du microenvironnement transduits par les différentes voies de signalisation décrites précédemment. Ces différents signaux vont permettre une régulation de SNAI1 d'une part, par la régulation de son taux au niveau transcriptionnel et d'autre part, par la régulation de son activation au niveau post-traductionnel.

3.1.1 La régulation transcriptionnelle de SNAI1

L'étude de la régulation transcriptionnelle de SNAI1, gène précoce impliqué dans la régulation de la TEM, a montré qu'il existe un promoteur dit minimal contenant un site de réponse aux voies ERK (Barberà et al., 2004). De plus, l'activation des voies RTK (Fambrough et al., 1999), PI3K (Barberà et al., 2004), MAPK (Grotegut et al., 2006), ainsi que la voie classique SMAD (Saika et al., 2004; Sato et al., 2003; Thuault et al., 2008) conduisent à l'activation de la transcription de *SNAI1*.

3.1.2 La régulation par des modifications post-traductionnelles de SNAI1

L'activation de SNAI1 est aussi régulée de manière rapide par des mécanismes de modifications post-traductionnelles conduisant d'une part à la modification de sa localisation cellulaire et d'autre part à sa dégradation (Figure 13).

SNAI1 est une protéine labile dont la demie vie est d'environ 25 min qui peut avoir une localisation cytoplasmique, mais c'est sa localisation nucléaire qui permet la régulation des gènes cibles. Le changement de localisation de SNAI1 est sous le contrôle de l'accès à sa séquence NES d'export nucléaire dépendant de sa phosphorylation par la kinase GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) nucléaire sur le second motif riche en sérine (Sérine 107, sérine 111, sérine 115 et sérine 119) induisant un changement conformationnel de SNAI1 (Figure 13, ①) permettant sa relocalisation cytoplasmique *via* le transporteur CRM1 (chromosomal maintenance 1) conduisant à une inhibition de la TEM (Figure 13, ②)(Zhou et al., 2004). La phosphatase SCP (Small C-terminal domain phosphatase) permet quant à elle la déphosphorylation des deux sites riches en sérine de SNAI1 inhibant sa reconnaissance par l'ubiquitine ligase et permet aussi la stabilisation de sa forme active nucléaire (Figure 13, ③)(Wu et al.,

2009). D'autres sites de phosphorylation ont été décrits comme permettant la régulation de la localisation de SNAI1. En effet, la localisation de SNAI1 peut aussi dépendre de sa phosphorylation sur sa sérine 11 par PDK1 (Protein kinase D1). Cette phosphorylation induit la liaison de SNAI1 avec la protéine 14-3-3 σ induisant sa relocalisation cytoplasmique et inhibant l'interaction de SNAI1 avec des co-régulateurs et ainsi la régulation des gènes cibles (Figure 13, ④)(Du et al., 2010). La phosphorylation de la sérine 246 de SNAI1, cible de la kinase PAK1 (P21 (RAC1) Activated Kinase 1), a aussi été mise en évidence comme impliquée dans la localisation cellulaire de SNAI1 en augmentant son accumulation au niveau nucléaire induisant ainsi la TEM (Figure 13, ⑤)(Yang et al., 2005). De plus, l'interaction entre SNAI1 avec les protéines LOXL2 (Lysyl oxidase-like 2) et LOXL3 (Lysyl oxidase-like 3) a été mise en évidence au niveau périmoléculaire. Elle pourrait permettre la régulation de la localisation de SNAI1 toutefois le mécanisme d'action reste flou (Figure 13, ⑥)(Peinado et al., 2005).

Les modifications post-traductionnelles de SNAI1 sont aussi à l'origine de la régulation de sa dégradation. En effet, lorsque SNAI1 est sous sa forme cytoplasmique phosphorylée au niveau du second motif riche en sérine, le premier motif riche en sérine (sérine 96, sérine 100 et sérine 104) peut être phosphorylé par la GSK-3 β cytoplasmique. SNAI1 est alors reconnu par l'ubiquitine ligase β -Trcp (β -transducin repeats-containing protein) conduisant à l'ubiquitinylation des lysines 98, 137 et 146 aboutissant à sa dégradation par le protéasome (Figure 13, ①)(Zhou et al., 2004). En plus des mécanismes de phosphorylation, l'acétylation de SNAI1 a été décrite comme inhibant son ubiquitinylation et donc de sa dégradation induisant ainsi la TEM (Figure 13, ②)(Jiang et al., 2013). La protéine FBXL-14 (F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 14) peut également interagir avec SNAI1 (sous sa forme phosphorylée ou non) dans le cytoplasme et permet son ubiquitinylation conduisant ainsi à sa dégradation par le protéasome (Figure 13, ③)(Viñas-Castells et al., 2010). En plus d'une régulation du taux protéique de SNAI1 par un contrôle de sa dégradation par le protéasome, SNAI1 peut également être dégradé par autophagie. En effet, en condition hypoxique, l'augmentation du taux protéique de SNAI1 est contrebalancé par une augmentation de sa dégradation par le processus d'autophagie (Zou et al., 2017). Le lien entre la TEM et l'autophagie sera détaillé dans la partie 5. TEM et Autophagie.

Les différents mécanismes de modifications post-traductionnelles permettant la régulation de SNAI1 induit une régulation rapide de la TEM et est sous le contrôle des différentes voies d'induction de la TEM. En effet, la régulation par GSK-3 β peut intervenir lors de l'induction de la TEM par les RTK, les voies MAPK, Wnt ou encore PI3K (Zhou et al., 2004) et la régulation par FBXL-14 lors de condition hypoxique (Viñas-Castells et al., 2010).

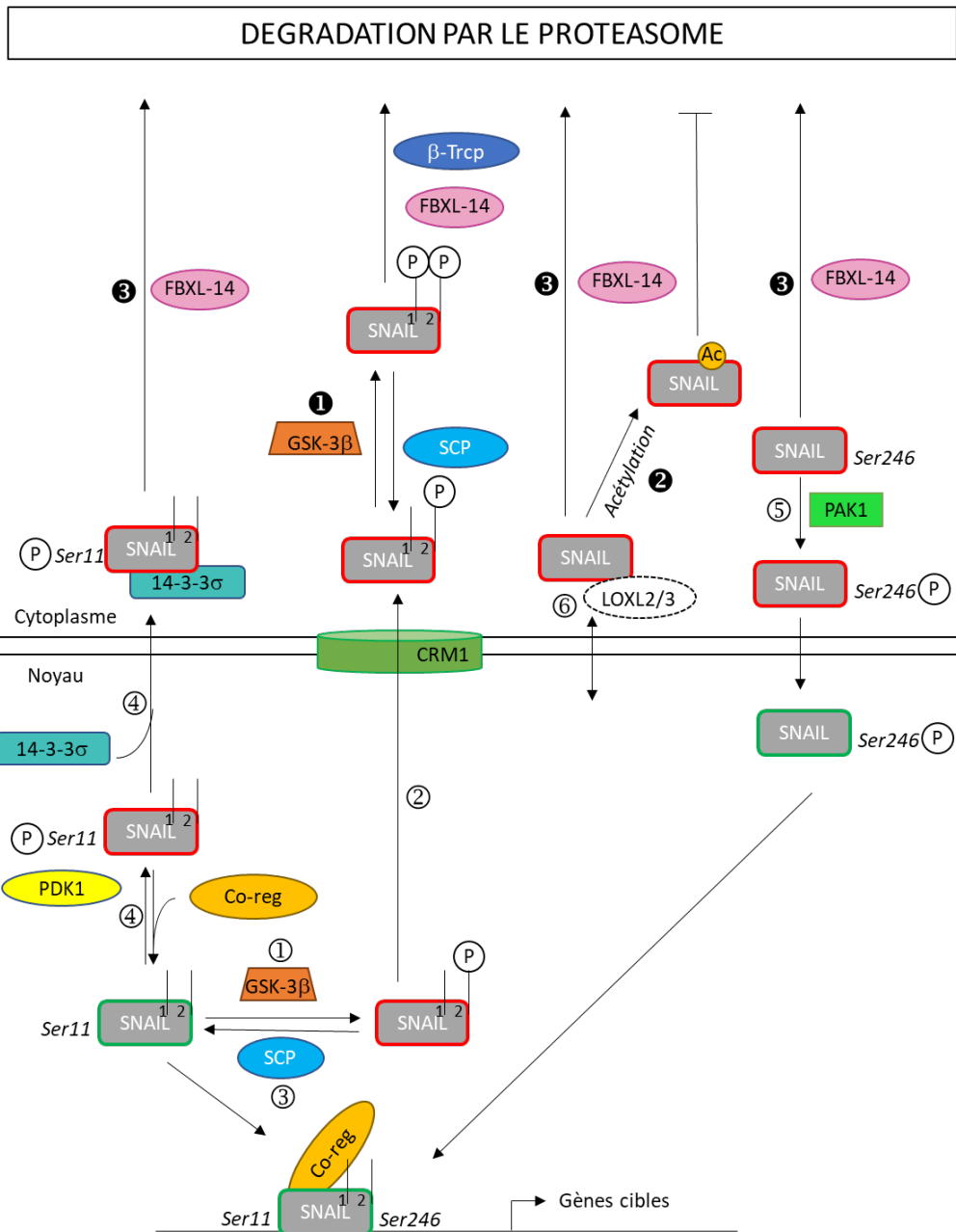


Figure 13 : Mécanisme de régulation de l'activité de SNAI1 par des modifications post-traductionnelles

Les modifications post traductionnelles de SNAI1 sont impliquées dans la localisation nucléaire ou cytoplasmique de SNAI1 (① - ⑥). La localisation cellulaire de SNAI1 dépend de sa phosphorylation par GSK-3β sur le second site riche en sérine ① au niveau nucléaire ce qui rend sa séquence d'export accessible par le CRM1 ②. La phosphatase SCP permet la déphosphorylation des deux sites riches en sérines ③ permettant son maintien dans le compartiment nucléaire. PDK1 permet la phosphorylation de la sérine 11 de SNAI1 permettant sa reconnaissance par 14-3-3σ induisant sa relocalisation cytoplasmique ④. La phosphorylation de la sérine 246 de SNAI1 par PAK1 induit sa localisation nucléaire ⑤. SNAI1 peut aussi interagir avec les protéines LOXL2 et LOXL3 au niveau périnucléaire, ces interactions seraient impliquées dans la régulation de sa localisation nucléaire vs cytoplasmique ⑥.

Les modifications post traductionnelles de SNAI1 sont aussi à l'origine de la régulation de sa dégradation (①-③). La phosphorylation de SNAI1 par GSK-3β sur le premier motif riche en sérine permet l'ubiquitinylation de SNAI1 par β-Trcp (lys 98, 137 et 146) aboutissant à la dégradation de SNAI1 par le protéasome ①. La désacétylation de SNAI1 inhibe son ubiquitinylation et donc sa dégradation ②. FBXL-14 permettrait également l'ubiquitinylation de SNAI1 aboutissant à sa dégradation par le protéasome ③.

3.2. Les facteurs de transcription TWIST

Les facteurs de transcription TWIST1 et TWIST2 appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH, et TWIST1 est le plus étudié. Les facteurs de transcription TWIST sont impliqués dans

la TEM *via* leur interaction avec des co-répresseurs des gènes épithéliaux ou de co-activateurs des gènes mésenchymateux au niveau des E-box de ces gènes. L'activité transcriptionnelle de TWIST1, appelé par la suite TWIST, peut être régulée au niveau transcriptionnel ou par des modifications post-traductionnelles.

3.2.1 *Au niveau transcriptionnel*

La régulation transcriptionnelle de TWIST est à ce jour que peu décrite. Toutefois, l'activation des voies d'induction de la TEM telles que RTK aboutissant à l'activation de STAT3 permet l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de *TWIST* (Cheng et al., 2008). De plus, *TWIST* est également induit lors de conditions hypoxiques. En effet, HIF1 α se fixe sur le promoteur de *TWIST* et induit ainsi son expression (Yang et al., 2008b).

3.2.2 *Au niveau post-traductionnel*

Des modifications post traductionnelles permettent aussi la régulation de TWIST. En effet, la phosphorylation de TWIST au niveau de sa sérine 68 suite à l'activation des voies MAPK (p38, JNK et ERK)(Hong et al., 2011) ou encore au niveau des sérine 18 et sérine 20 par CK2 (Casein kinase 2)(Su et al., 2011) aboutit à une augmentation de la stabilité de TWIST induisant la TEM. De plus, il a été décrit que la phosphorylation de TWIST au niveau de la sérine 42 par Akt inhibait la sénescence cellulaire dans des conditions de stress (Ansieau et al., 2008). Des modifications post-traductionnelles de TWIST ont été décrites comme impliquées dans le développement. En effet, les phosphorylations de la thréonine 121 et de la sérine 123 par PKA/B (Protein kinase A/B) modifiant ainsi les partenaires d'interaction de TWIST dérégule le développement des membres (Firulli et al., 2005, 2007) ou le développement cardiaque (Lu et al., 2011) et pourrait donc également intervenir dans la TEM.

3.3. Les facteurs de transcription ZEB

ZEB1 et ZEB2 sont les 2 membres de la famille ZEB dont ZEB1, appelé par la suite ZEB, est le plus étudié. Les facteurs de transcription ZEB, comme les facteurs SNAI1 et TWIST, sont décrits comme des répresseurs transcriptionnels par leurs interactions avec des corépresseurs tels que des HDAC (Shi et al., 2003) mais ce sont aussi des activateurs transcriptionnels par leur interaction avec des coactivateurs tel que p300 (Postigo et al., 2003) en fonction du contexte cellulaire. Ils permettent ainsi la régulation de gènes cibles *via* leur fixation sur les E-Box. La régulation de l'activité de ZEB implique une régulation au niveau transcriptionnel mais aussi post-traductionnel.

3.3.1 Au niveau transcriptionnel

L'activation des voies de signalisation Wnt (Sánchez-Tilló et al., 2011), Notch (Wang et al., 2009), SMAD (Joseph et al., 2014) ainsi que PI3K (Wu et al., 2012) conduit à l'augmentation de l'expression de ZEB.

3.3.2 Au niveau post traductionnel

Malgré le fait que ZEB puisse être la cible de phosphorylations permettant un switch de son rôle dans l'activation ou dans la répression de la transcription (Costantino et al., 2002), contrairement à ce qui a été décrit précédemment pour SNAI1 et TWIST, aucune étude ne met à ce jour en lumière une régulation de l'activation de ZEB par phosphorylation au cours de la TEM. ZEB est majoritairement décrit comme un répresseur transcriptionnel, toutefois l'acétylation de ZEB par P/CAF (P300/CBP-associated factor) modifie les partenaires d'interaction de ZEB et conduit à un rôle d'activateur de la transcription (Postigo et al., 2003).

4. Les gènes cibles des EMT-TF

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'activation des voies de la TEM aboutissent à l'activation des EMT-TFs permettant la régulation de gènes cibles. Au cours de la TEM est généralement observé le « switch des cadhérines ». Cela consiste en la diminution de l'expression de *CDH1*, gène codant pour la E-Cadhérine et une augmentation de l'expression de *CDH2*, gène codant pour la N-Cadhérine, deux glycoprotéines transmembranaires. Bien que ces deux protéines soient impliquées dans l'établissement des jonctions intercellulaires, la E-Cadhérine est majoritairement décrite comme permettant les jonctions adhérentes impliquées dans la restriction des mouvements cellulaires alors que la N-Cadhérine serait impliquée dans l'établissement de jonctions labiles facilitant le mouvement cellulaire. La TEM consiste également en la mise en place de structures impliquées dans l'invasion telles que la mise en place du cytosquelette contractile ou encore dans la sécrétion d'enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice extracellulaire.

4.1. Répression du phénotype épithélial : E-Cadhérine

Lors de l'étude de la TEM, la diminution de la E-Cadhérine est un marqueur très largement étudié. La E-Cadhérine permet de créer un pont entre le cytosquelette (actine corticale et microtubules) de deux cellules adjacentes permettant l'établissement d'une organisation tissulaire. Bien qu'il soit évident que la diminution de la E-Cadhérine induit une diminution du nombre de jonctions intercellulaires conduisant ainsi à une déstructuration tissulaire, le rôle de la E-Cadhérine ne se limite pas à son rôle structurel. En effet, la E-Cadhérine est aussi un médiateur de nombreuses voies de signalisation (la différenciation, le maintien de la polarité cellulaire, l'inhibition de l'acquisition de

propriétés de cellules souche) expliquant que sa diminution représente une étape clef dans l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules (Chen et al., 2014).

Ainsi, la diminution de la E-Cadhérine a été décrite comme impliquée dans le développement de tumeurs infiltrantes et métastatiques ainsi que dans la dédifférenciation cellulaire (Birchmeier and Behrens, 1994). De plus, la surexpression de la E-Cadhérine dans des lignées cellulaires invasives diminue l'invasion et induit la formation de tumeurs différenciées *in vivo* et l'inhibition de la E-Cadhérine conduit à un retour au phénotype invasif de ces cellules (Vleminckx et al., 1991).

4.1.1 Mécanisme de répression de *CDH1* au cours de la TEM

La diminution de l'expression de *CDH1*, observée dans de nombreux cancers (colon, sein, prostate, estomac, foie, œsophage, peau, rein ou encore poumon), résulte d'une inactivation du gène par mutation, de la protéolyse du domaine extracellulaire de la protéine ou encore d'une répression transcriptionnelle (Hazan et al., 2004). Au cours de la TEM, le mécanisme majoritaire permettant la diminution de l'expression de la E-Cadhérine est la répression transcriptionnelle en conséquence de l'activation des différentes voies de signalisation de la TEM aboutissant à la fixation des EMT-TFs SNAI1, TWIST, ZEB1 et ZEB2 sur les E-Box du promoteur de *CDH1*. Ces EMT-TFs, *via* leurs interactions avec des corépresseurs, diminuent l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine aboutissant à une diminution de la transcription. A ce jour, de nombreux complexes protéiques impliquant les EMT-TFs et des corépresseurs ont été décrits comme inhibant la transcription de *CDH1* (Tableau 1).

EMT-TF	Corépresseurs	Enzyme de modification de la chromatine	Cible(s)	Références
SNAI1	SIN3A	HDAC	H3, H4	(Peinado et al., 2004)
	PRC2	HMT	H3K27	(Herranz et al., 2008)
	Suv39H1	HMT	H3K9	(Dong et al., 2013)
	AJUBA	HRT : PRMT5	H4R3	(Hou et al., 2008)
	Co-REST	HMT : LSD1	H3K4me2	(Lin et al., 2010)
	SMAD3/SMAD4	<i>Non caractérisé</i>	<i>Non caractérisé</i>	(Vincent et al., 2009)
TWIST	<i>Non caractérisé</i>	HMT : SET8	H4K20me1	(Yang et al., 2012)
	Mi2/NuRD	HDAC2	<i>Non caractérisé</i>	(Fu et al., 2011)
ZEB	CtBP	HDAC1/HDAC2	H3K9	(Aghdassi et al., 2012)
	<i>Non caractérisé</i>	HMT : G9a, EuHMT	H3K9	(Shi et al., 2003)
	<i>Non caractérisé</i>	SIRT1	H3	(Byles et al., 2012)
	BRG1	<i>Non caractérisé</i>	<i>Non caractérisé</i>	(Sánchez-Tilló et al., 2010)
	<i>Non caractérisé</i>	DNMT1	Méthylation ADN	(Fukagawa et al., 2015)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents complexes protéiques impliquant les facteurs de transcription SNAI1, TWIST et ZEB dans la répression directe de la transcription de CDH1. Les facteurs de transcription de la TEM permettent le recrutement d'un corépresseur qui va recruter une enzyme de modification des histones conduisant au compactage de la chromatine : une histone méthyle transférase (HMT), une histone désacétylase (HDAC ou SIRT1) ou une histone arginine transférase (HRT). ZEB a aussi été décrit comme permettant le recrutement d'enzymes de modification de la méthylation de l'ADN (DNA methyl transferase 1 : DNMT1). Les corépresseurs, les enzymes de modification ou encore les cibles ne sont à ce jour pas encore tous caractérisés.

4.1.2 E-Cadhérine et voies de signalisation

En plus de diminuer les contacts intercellulaires et donc d'induire une désorganisation tissulaire, la diminution de la E-Cadhérine est aussi un stimulus oncogénique permettant d'une part la déstructuration de l'organisation du cytosquelette et d'autre part l'activation de voies de signalisation telles que la voie Wnt ou encore la voie RTK.

Les jonctions intercellulaires médiées par la E-Cadhérine interagissent avec les filaments d'actine ou encore les microtubules *via* de nombreux complexes protéiques permettant des propriétés de sensibilité des forces mécaniques, de transports vésiculaires, de régulation de la stabilité et de l'orientation du réseau de microtubules ainsi que du réseau d'actine (Brieher and Yap, 2013). Le réseau de microtubules s'organise au sein d'une cellule épithéliale de manière étoilée du centre organisateur des microtubules localisé au niveau périnucléaire vers la périphérie cellulaire. L'invalidation de la E-Cadhérine conduit à une désorganisation de ce réseau et à une perturbation de la liaison des microtubules avec les jonctions cellulaires induisant une perturbation de l'adressage des vésicules vers

ces jonctions (Chen et al., 2014). Au niveau du réseau des filaments d'actine, l'inhibition de la E-Cadhérine conduit à la mise en place de fibres de stress contractiles impliquées dans la mobilité cellulaire (Haynes et al., 2011). Ces modifications au niveau du cytosquelette induisent la modification de la structure cellulaire ainsi que l'organisation tissulaire.

La E-Cadhérine serait aussi impliquée dans la régulation de certaines voies de signalisation. Bien que l'implication de la E-Cadhérine dans la voie Wnt soit encore mal caractérisée, il a été montré qu'une forte expression de E-Cadhérine inhibait la voie Wnt alors qu'une diminution de la E-Cadhérine permet de potentialiser la voie Wnt et ainsi induire la TEM (Jeanes et al., 2008) comme décrit précédemment (Paragraphe III.2.2). De plus, la E-Cadhérine est aussi impliquée dans la régulation des voies de signalisation RTK de la TEM. En effet, il a été décrit que le récepteur aux facteurs de croissance EGF (Epidermal growth factor) peuvent interagir avec la E-Cadhérine *via* la β -caténine (Hoschuetzky et al., 1994) mais pas avec la N-Cadhérine. Cette interaction, inhibant ainsi la mobilité du récepteur, diminue son activation par la fixation de son ligand et conduit à une diminution de la prolifération cellulaire (Qian et al., 2004). De plus, bien que le mécanisme ne soit pas encore élucidé, l'inactivation de *CDH1* conduit à une augmentation de l'expression des métalloprotéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire conduisant à une augmentation de l'invasion des cellules (Chen et al., 2014).

4.2. Activation du phénotype mésenchymateux

Un des marqueurs mésenchymateux clefs observés au cours de la TEM est l'augmentation de la N-Cadhérine. La N-Cadhérine, impliquée dans des interactions labiles cellules-cellules est décrite comme largement impliquée dans la mobilité cellulaire. En effet, la surexpression de la N-Cadhérine est décrite dans des cas de cancers invasifs (sein, prostate ou encore mélanomes)(Hazan et al., 1997; Hsu et al., 1996; Tomita et al., 2000). De plus, la surexpression de la N-Cadhérine dans une lignée épithéliale conduit à l'acquisition d'un phénotype fibroblastique et de propriétés d'invasion (Hazan et al., 2000; Islam et al., 1996).

4.2.1 Mécanisme de régulation de la N-Cadhérine au cours de la TEM

Les mécanismes d'activation de la transcription de *CDH2* par les EMT-TFs sont à ce jour peu décrits. Toutefois, un des EMT-TFs impliqué dans la régulation directe de *CDH2* est TWIST. En effet, il a été décrit que l'inactivation de TWIST conduit à une diminution de l'expression de *CDH2*. TWIST peut se fixer au niveau des E-Box sur le promoteur de *CDH2* (Alexander et al., 2006).

4.2.2 N-Cadhérine et voies de signalisation

Comme décrit pour le E-Cadhérine, la N-Cadhérine en plus de son rôle structurel permet l'activation de voies de signalisation cellulaires. En effet, la N-Cadhérine permet l'activation de

récepteur RTK comme décrit pour le FGFR (Fibroblast growth factor receptor) qui par sa liaison au récepteur inhibe son internalisation suite à la fixation du ligand conduisant à une augmentation de sa stabilité aboutissant à une suractivation des voies MAPK ERK et à la sécrétion de métalloprotéases MMP-9 (Suyama et al., 2002).

Pour conclure, la Transition Epithélio-Mésenchymateuse est un mécanisme qui peut être induit par de nombreuses voies de signalisation permettant d'aboutir à l'activation ou à l'expression des facteurs de transcription clefs de la TEM (EMT-TFs). Ce sont ces EMT-TFs qui vont permettre par leurs interactions avec de nombreux cofacteurs une régulation des gènes cibles impliqués dans la TEM. Bien que la régulation de la transcription de *CDH1* et *CDH2* ait été décrite du fait de leur implication majeure dans le processus de TEM, de nombreux autres gènes sont la cible des voies de signalisation de la TEM et sont impliqués dans l'acquisition de propriétés mésenchymateuses des cellules et la perte des caractéristiques épithéliales (**Tableau 2**). De plus, la régulation de ces gènes pourrait faire intervenir d'autres facteurs de transcription mais aussi des miRNA. La TEM est ainsi un ensemble de voies inter-régulées nécessitant encore l'approfondissement des connaissances afin de comprendre la régulation fine des mécanismes mis en jeu.

Gènes épithéliaux	Gènes mésenchymateux
EPCAM	Vimentine
Cytokératine	MMP2
Desmoplakine	MMP3
Occludine	MMP9
	Fibronectine

Tableau 2 : Principaux autres gènes épithéliaux dont l'expression est diminuée au cours de la TEM et mésenchymateux dont l'expression est augmentée au cours de la TEM

5. TEM et autophagie

Le lien entre l'autophagie et la TEM, à l'instar du lien entre l'autophagie et le cancer, est complexe. En effet, de nombreuses études ont démontré que l'autophagie était plutôt un mécanisme inhibiteur de la TEM *via* la dégradation de certains acteurs de ce mécanisme. A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence plutôt la nécessité d'une autophagie active dans les cellules pour permettre l'induction de la TEM. Même si ces études sont contradictoires, il existe toutefois un lien évident entre les deux mécanismes du fait de leurs stimuli, voies d'induction et acteurs moléculaires communs (Figure 14).

5.1. Stimuli, acteurs et voies de signalisation communs de la TEM et de l'autophagie

De nombreux stimuli trouvés dans le microenvironnement tumoral sont des inducteurs de la TEM mais également de l'autophagie. De plus, des voies de signalisation de l'autophagie telle que PI3K/Akt/MTOR ou encore BECLIN1 sont également impliqués dans la régulation de la TEM

Comme décrit précédemment, le TGF β , inducteur clef de la TEM, a été décrit comme permettant également l'induction de l'autophagie en augmentant l'expression des gènes de l'autophagie *BECLIN1*, *ATG5* ou encore *ATG7* via l'induction des voies SMAD (Kiyono et al., 2009).

De plus, certaines voies de signalisation sont communes à l'autophagie et à la TEM. En effet, il a été décrit que la voie PI3K/Akt/MTOR, voie décrite comme induisant l'autophagie, a également un rôle dans la TEM. En effet, l'inhibition de MTOR est également décrite comme une voie d'induction de la TEM (Mikaelian et al., 2013). De plus, une étude dans un modèle de cancer colorectal, a mis en évidence que l'inhibition de MTOR conduit à une diminution de la migration et de l'invasion des cellules. Le mécanisme moléculaire implique l'inhibition des voies Rho like GTPase RhoA et Rac1 impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire (Gulhati et al., 2011). De manière similaire, il a été décrit que l'activation de PI3K/Akt/MTOR conduit à l'augmentation de l'expression de la β -caténine induisant la TEM (Li et al., 2014). Finalement, l'activation de la voie PI3K/Akt/MTOR par le TGF β conduit à l'augmentation des EMT-TF SNAI1 et SNAI2 conduisant à la TEM (Wendt et al., 2010).

Les effets de l'utilisation de la rapamycine comme inhibiteur de MTORC1 semblent toutefois de faible utilité en clinique dans le cadre de cancer hépatocellulaire alors que l'utilisation d'un inhibiteur de MTORC1 et MTORC2 (AZD2014) semble plus efficace dans l'inhibition de la TEM de ces cellules cancéreuses (Liao et al., 2015). De manière similaire, une étude récente dans un modèle de glioblastome a également mis en évidence l'importance de l'utilisation d'un inhibiteur ciblant MTORC1 et MTORC2, le PP242, conduisant à une augmentation de l'autophagie inhibant la migration et l'invasion cellulaire (Mecca et al., 2018).

L'utilisation de plusieurs traitements tels que les inhibiteurs de kinase le Danusertib dans le cadre de cancer de l'ovaire ou encore l'Alisertib dans le cas de cancers colorectaux ont été décrits comme étant impliqués dans l'induction de l'autophagie et de l'apoptose mais également dans l'inhibition de la TEM. Le mécanisme moléculaire fait intervenir une inhibition de la voie PI3K/Akt impliquée dans l'autophagie et dans la TEM (Ren et al., 2015; Zi et al., 2015).

De manière similaire, d'autres acteurs sont communs à l'autophagie et la TEM. C'est le cas de BECLIN1. BECLIN1 est impliquée dans la formation du complexe d'initiation de l'autophagie PI3KC3-C1 et il a été décrit que l'inactivation de BECLIN1 dans des cellules cancéreuses de la thyroïde conduit à

une stabilisation de l'ARNm de ZEB1 conduisant à la TEM (Li et al., 2016). De manière similaire, l'inactivation de BECLIN1 permet également l'activation des voies de signalisation WNT1 et NF- κ B conduisant à la formation de métastases des cellules cancéreuses mammaires suggérant également que l'inactivation de BECLIN1 induise la TEM (Cicchini et al., 2014).

5.2. L'autophagie inhibe la TEM

De nombreuses études ont démontré que l'autophagie permet l'inhibition de la TEM. L'autophagie est un mécanisme de dégradation, ainsi l'autophagie pourrait dégrader des acteurs impliqués dans la TEM tel que les EMT-TFs empêchant ainsi la régulation de leurs gènes cibles. De plus, l'autophagie permet également la dégradation des inducteurs de la TEM tels que les ERO.

Initialement, il a été décrit que des inducteurs de la TEM tel que le TGF β peut être dégradé par autophagie. En effet, l'inactivation de LC3 dans des cellules rénales transformées conduit à une diminution de sa dégradation par autophagie (Ding et al., 2014). Puis, dans un modèle de cancer du sein, il a été décrit que l'induction de l'autophagie lors d'une surexpression de DEDD (Death-effector domain-containing DNA-binding protein) interagissant directement avec le complexe d'initiation de l'autophagie PI3KC3 conduisait à une dégradation de SNAI1 et de TWIST par autophagie inhibant ainsi la régulation de leurs gènes cibles (Lv et al., 2012). En effet, il a été montré dans des modèles cellulaires de carcinome de poumon, de glioblastome, de cancer de sein ou encore du colon que l'inhibition de l'autophagie par des molécules chimiques (Bafilomycine A1, Chloroquine et 3-Méthyladénine) ou par inactivation génique (KO ATG5/Si ATG5 ou KO ATG7/si ATG7) de l'autophagie conduit à une augmentation du taux protéique de SNAI1 et de TWIST. De plus, SNAI1 et TWIST peuvent être localisés dans les autophagosomes et peuvent interagir avec p62 suggérant que leur dégradation fasse intervenir une autophagie de type sélective (Catalano et al., 2015; Grassi et al., 2015; Lv et al., 2012). De manière similaire, l'inhibition de l'autophagie conduit à une accumulation de TWIST et de p62 dans des modèles cellulaires murins embryonnaires MEF et non tumoraux de rein HEK293T. p62 se lie à TWIST empêchant également sa dégradation par le protéasome conduisant ainsi à l'induction de la TEM (Qiang et al., 2014). De plus, dans un modèle de gliome, il a été décrit que l'induction de l'autophagie conduit à la dégradation de Dvl inhibant la voie Wnt et induisant une relocalisation de la β -caténine du noyau vers le cytoplasme diminuant ainsi la régulation des gènes cibles et conduisant à son interaction avec la E-Cadhérine impliquée dans le maintien des jonctions intercellulaires inhibant la TEM (Colella et al., 2019). De plus, l'autophagie permettrait également la dégradation de la β -caténine conduisant à une inhibition de la TEM (Guo et al., 2018). Il a également été décrit que l'induction de l'autophagie par carence en acides aminés ou par inhibition de MTOR conduit à l'inhibition de la migration et de l'invasion dans des cellules de glioblastome. Inversement, l'inhibition de l'autophagie stimule la migration et l'invasion de

ces cellules (Catalano et al., 2015). Dans un modèle de cancer gastrique, il a été décrit que l'inhibition de l'autophagie permet l'induction de la TEM. En effet, les ERO intracellulaires n'étant plus dégradés conduisent à la translocation de NF- κ B (nuclear factor kappa B) dans le noyau induisant une augmentation de l'expression de HIF-1 α Impliqué dans la régulation des gènes de la TEM (Qin et al., 2015).

5.3. L'autophagie est nécessaire à la TEM

Plusieurs études ont quant à elles démontré l'importance d'une autophagie active lors de la TEM. En effet, lors de la reproduction *in vitro* de conditions généralement trouvées au sein d'une tumeur (hypoxie, carence nutritive...) qui conduisent à une induction de l'autophagie et de la TEM, il apparaît que l'inhibition de l'autophagie inhibe la TEM. De plus, une étude récente a mis en évidence l'implication des cellules du microenvironnement tumoral dans l'autophagie des cellules cancéreuses régulant la TEM de ces cellules (Luo et al., 2018).

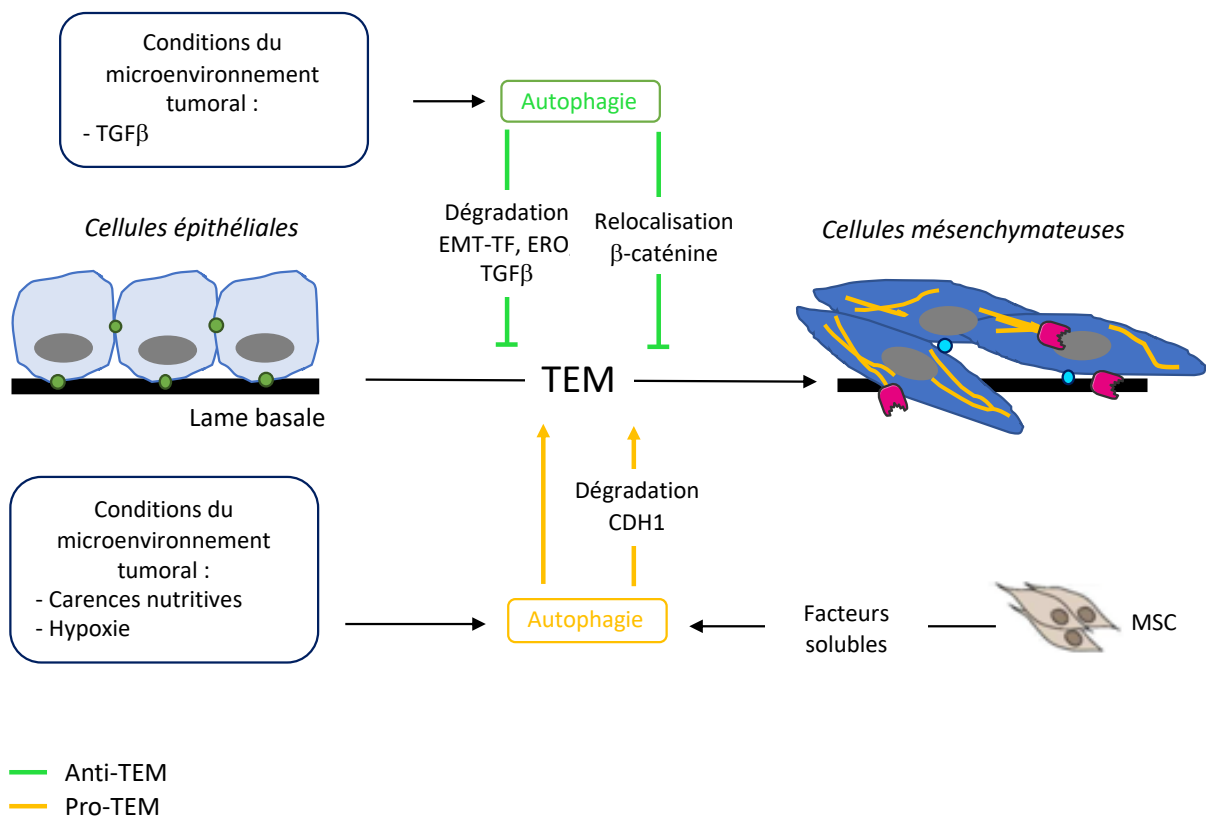


Figure 14 : Rôles pro- et anti-TEM de l'autophagie

L'autophagie aurait un rôle inhibiteur de la TEM via son implication dans la dégradation de facteurs de transcription de la TEM (EMT-TF) tels que *SNAI1*, *TWIST* mais également dans la dégradation de la β -caténine ainsi que dans sa localisation nucléaire vs cytoplasmique. L'autophagie permet également l'élimination d'inducteurs de la TEM tels que les ERO. Toutefois, l'autophagie peut également être un mécanisme permettant la TEM. En effet, lors de carences nutritives ou encore d'hypoxie, conditions généralement retrouvées dans le microenvironnement tumoral, l'induction de l'autophagie est nécessaire à la TEM. De manière similaire, les cellules du microenvironnement tumoral les MSC (Mesenchymal stem cell) permettraient la sécrétion de facteurs solubles induisant la TEM de manière dépendante de l'autophagie. Bien que les mécanismes moléculaires de l'autophagie pro-TEM soit encore peu décrits, ils pourraient impliquer une dégradation de CDH1 par autophagie.

L'autophagie a été décrite comme permettant l'induction de la TEM dans un modèle de cancer de vessie. Dans cette étude, l'induction de l'autophagie par carence en acides aminés induit la migration et l'invasion des cellules par une augmentation de l'expression du TGF β activant ainsi la voie SMAD par une augmentation de la phosphorylation de SMAD3. Puis, l'augmentation du TGF β induit l'autophagie conduisant ainsi à la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive permettant l'augmentation de l'invasion et de la migration des cellules (Tong et al., 2018). De manière similaire, lors de conditions hypoxiques, l'expression du facteur de transcription HIF-1 α est induite et conduit à une induction de la TEM *via* l'autophagie. En effet, HIF-1 α induit la TEM de manière dépendante de l'autophagie puisque l'inhibition chimique de l'autophagie par le 3-MA (3-Méthyladénine) dans des conditions d'hypoxie inhibe la TEM (Zhu et al., 2014). L'autophagie a également été décrite comme nécessaire à l'induction de la TEM dans des modèles de gliome. Initialement, le TGF β a été décrit comme permettant l'induction de la TEM *via* l'autophagie puisque l'inhibition de l'autophagie par invalidation génétique de BECLIN1 inhibe la TEM (Zou et al., 2016). Puis, il a également été décrit que le MIR517C, conduisait à l'inhibition de la TEM *via* l'inhibition de l'autophagie (Lu et al., 2015).

Un des traitements utilisés dans le traitement de tumeurs est l'inhibiteur de kinase Sorafenib. Toutefois, les résultats obtenus en essais clinique de phase II sont décevants et sont expliqués par le fait que le Sorafenib induit l'autophagie dans les cellules tumorales. L'inhibition de l'autophagie a été décrite comme diminuant la viabilité cellulaire, la migration et l'invasion des cellules (Liu et al., 2016). Il a également été décrit dans un modèle de glioblastome que l'autophagie était nécessaire à la TEM puisque l'invalidation d'acteurs de l'autophagie tel que ATG7 conduit à une diminution de l'invasion cellulaire associée à une régulation du métabolisme énergétique (Galavotti et al., 2013) et que l'invalidation de ATG12 conduit à une diminution de l'invasion dans un modèle de gliome organotypique (Macintosh et al., 2012).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la TEM par l'autophagie sont encore peu connus. Toutefois, il a été décrit que l'autophagie est impliquée dans la dégradation de la E-Cadhérine diminuant ainsi son taux protéique intracellulaire, étape clef de la TEM dans un modèle de carcinome hépatocellulaire. En effet, SPHK1 (Sphingosine kinase 1), dont l'expression augmente avec le stade du cancer, permet l'ubiquitylation de BECLIN1 induisant la dégradation par autophagie de la E-Cadhérine (Liu et al., 2017).

Récemment, une étude de co-culture de cellules A549 de carcinome de poumon avec des MSCs (Mesenchymal stem cells) a montré une induction de la TEM et de l'autophagie dans les cellules A549. De plus, l'induction de la TEM dans ces cellules est dépendante de l'autophagie puisque l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA ou par la Bafilomycine diminue la TEM. Toutefois, dans cette étude, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de l'autophagie dans le milieu de culture ne permet pas de déterminer si *i)* c'est

l'inhibition de l'autophagie qui inhibe la sécrétion de l'inducteur de la TEM par les cellules MSCs, si *ii*) c'est l'inhibition de l'autophagie dans les cellules A549 qui inhibe la TEM ou *iii*) si l'inhibition de l'autophagie dans les deux types cellulaires est impliquée dans l'inhibition de la TEM des cellules A549. D'autres études avec l'utilisation de modèles d'inactivation de l'autophagie tels que MSCs KO ATG5 et A549 KO ATG5 seraient nécessaires. Toutefois, cette étude montre qu'un inducteur de l'autophagie serait sécrété par les MSCs. Cet inducteur pourrait être des ERO, des cytokines ou encore des facteurs de croissance (Luo et al., 2018).

Le lien entre autophagie et TEM reste ainsi controversé et pourrait ainsi dépendre du type de tumeur mais également du stade. Lors des étapes précoces, l'autophagie permettrait la dégradation des facteurs de transcription de la TEM et permettrait également l'élimination des stress cellulaires impliqués dans l'induction de la TEM. Lors des étapes plus tardives, l'acquisition de mutations par les cellules tumorales conduirait à la dérégulation de nombreuses voies de signalisation communes à la TEM et à l'autophagie telle qu'une dérégulation de MTOR largement décrite dans 50% des cancers hépatocellulaires (Liao et al., 2015). Ainsi l'inhibition de l'autophagie impliquerait une inhibition de la TEM.

5.4. La TEM et protéines ATG8

Le rôle des protéines ATG8 au cours de la TEM n'a à ce jour pas été spécifiquement étudié. Toutefois, comme décrit précédemment, il apparaît que l'autophagie sélective mettant en jeu les protéines ATG8, serait impliquée dans la dégradation des facteurs de transcription de la TEM. Ainsi, les protéines ATG8 auraient un rôle anti-TEM *via* leur implication dans des mécanismes de dégradation sélective.

Du fait de l'implication de la TEM dans la formation des métastases, du lien étroit entre autophagie et TEM et de l'implication des protéines ATG8, et particulièrement de GABARAPL1 dans la carcinogenèse et dans l'autophagie, nous nous sommes intéressés au rôle de GABARAPL1 au cours de la TEM. Notre hypothèse de départ était que GABARAPL1 inhibe la TEM en dégradant sélectivement des EMT-TFs puisque SNAI1 et TWIST ont été décrits comme étant localisés dans les autophagosomes.

La compréhension du rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 au cours de la TEM permettra à terme de développer de nouveaux traitements anti-cancéreux en ciblant un type d'autophagie sans inhiber le mécanisme global d'autophagie.

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires utilisées

Les lignées MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) et BT474 sont des lignées cellulaires humaines de cancer de sein. Les lignées A549 et ACHN sont des lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome de poumon et de rein respectivement. Ce sont toutes des cellules de type épithéliale.

1.1. Modèles cellulaires de surexpression de GABARAPL1

Les cellules MCF-7 et BT474 expriment très peu de base GABARAPL1 et constituent ainsi un bon modèle de surexpression. Deux modèles de surexpression ont été établis, l'un surexprimant la protéine GABARAPL1 additionnée d'une étiquette FLAG en N-ter et d'une étiquette 6-HIS en C-ter (Flag-GABARAPL1-6His) et un autre modèle muté avec remplacement de la Glycine en position 116 par une Alanine (Flag-GABARAPL1-G116A-6His).

1.1.1 MCF-7C, Flag-GABARAPL1-6His, Flag GABARAPL1-G116A-6His c1 et c2

Les cellules MCF-7 Flag-GABARAPL1-6His et MCF-7 Flag-GABARAPL1-G116A-6His c1 et c2 où les protéines Flag-GABARAPL1-6His ou Flag-GABARAPL1-G116A-6His sont surexprimées et les cellules MCF-7C résultent de la transfection des cellules MCF-7 par le plasmide pCDNA3.1 Flag-GABARAPL1-6His, pCDNA3.1 Flag-GABARAPL1-G116A-6His ou pCDNA3.1 vide respectivement. Ces cellules présentent une résistance à l'hygromycine.

Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM à 1 g/L de glucose contenant 1% de L-glutamine (L0066, Dominique Dutcher) et supplémenté de 10% de SVF (sérum de veau fœtal, 702774C, Corning), d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine) et d'un antifongique (Amphotericin B 0,23 U/mL).

1.1.2 BT474

Les modèles de surexpression BT474 Flag-GABARAPL1-6His et BT474 Flag-GABARAPL1-G116A-6His ou BT474C ont été réalisés par transfection transitoire des plasmides d'expression pCDNA3.1 Flag-GABARAPL1-6His, pCDNA3.1 Flag-GABARAPL1-G116A-6His ou pCDNA3.1 vide respectivement.

Les cellules BT474 ont été cultivées dans du milieu RPMI (L0498-500, Dominique Dutcher) supplémenté de 10% de SVF (702774C, Corning), d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine) et d'un antifongique (Amphotericin B 0,23 U/mL).

1.2. Modèles cellulaires d'invalidation de GABARAPL1

Les cellules A549 et ACHN sont des lignées inductibles en TEM par un co-traitement TGF β /TNF α et qui expriment GABARAPL1. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM à 1 g/L de glucose contenant 1% de L-glutamine (L0066, Dominique Dutcher) et supplémenté de 10% de SVF (702774C, Corning), d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine) et d'un antifongique (Amphotericin B 0,23 U/mL). Les lignées A549 et ACHN KO GABARAPL1 (KO GL1) ont été obtenues par la technique CRISPR/Cas9.

1.2.1 La technologie CRISPR/Cas9

La technologie CRISPR/Cas9 consiste en la transfection d'un plasmide codant pour une endonucléase la Cas9, d'un ARN guide permettant de cibler la zone d'intérêt dans l'ADN génomique à cliver et de la GFP (Green Fluorescent Protein). La GFP permet de trier sur la fluorescence verte les cellules transfectées. Suite à la coupure double brin de l'ADN génomique par la Cas9 au niveau de la zone ciblée par l'ARN guide, va intervenir le système de réparation à l'ADN de la cellule qui va permettre soit la réparation à l'identique de l'ADN avant coupure soit l'insertion de mutations. L'insertion des différentes mutations peut être déterminée par séquençage de l'ADN génomique pour chaque clone obtenu.

Les lignées A549 et ACHN sauvages ont été transfectées (voir paragraphe I.4. Transfection cellulaire) par les plasmides pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1a, pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1b ou pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1c obtenus grâce à une collaboration avec le CNRS-UMR7242 de Strasbourg. Le plasmide pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1a cible le début de l'exon 1, pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1b cible la fin de l'exon 1 ou pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1c cible l'exon 2 du gène *gabarapl1*. Les cellules GFP positives ont été triées (SONYSH600) et remises en culture à raison de 5000 cellules par boîte de pétri dans du milieu complet. Les clones ont ensuite été prélevés individuellement. Pour chaque lignée, plus d'une cinquantaine de clones ont été prélevés, amplifiés puis l'expression de GABARAPL1 a été testée par Western blot en présence d'inhibiteur de la dégradation autophagique NH₄Cl.

Les lignées A549 et ACHN sauvages ont également été transfectées (voir paragraphe I.4) par un plasmide pCAS9-GFP-sgRNA contrôle permettant l'obtention des lignées A549c et ACHNc.

1.2.2 A549, A549 KO GABARAPL1 c1 et c3

Trois clones A549 KO GABARAPL1 ont été obtenus : A549 KO GL1 c1, c2 et c3. Les trois clones ont été obtenus grâce aux plasmides pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1a, b et c. Le clone c1 est issu de la transfection par le plasmide pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1a, le clone c2 de la transfection par le

plasmide pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1c et le clone c3 de la transfection par le plasmide pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1b (Figure 15).

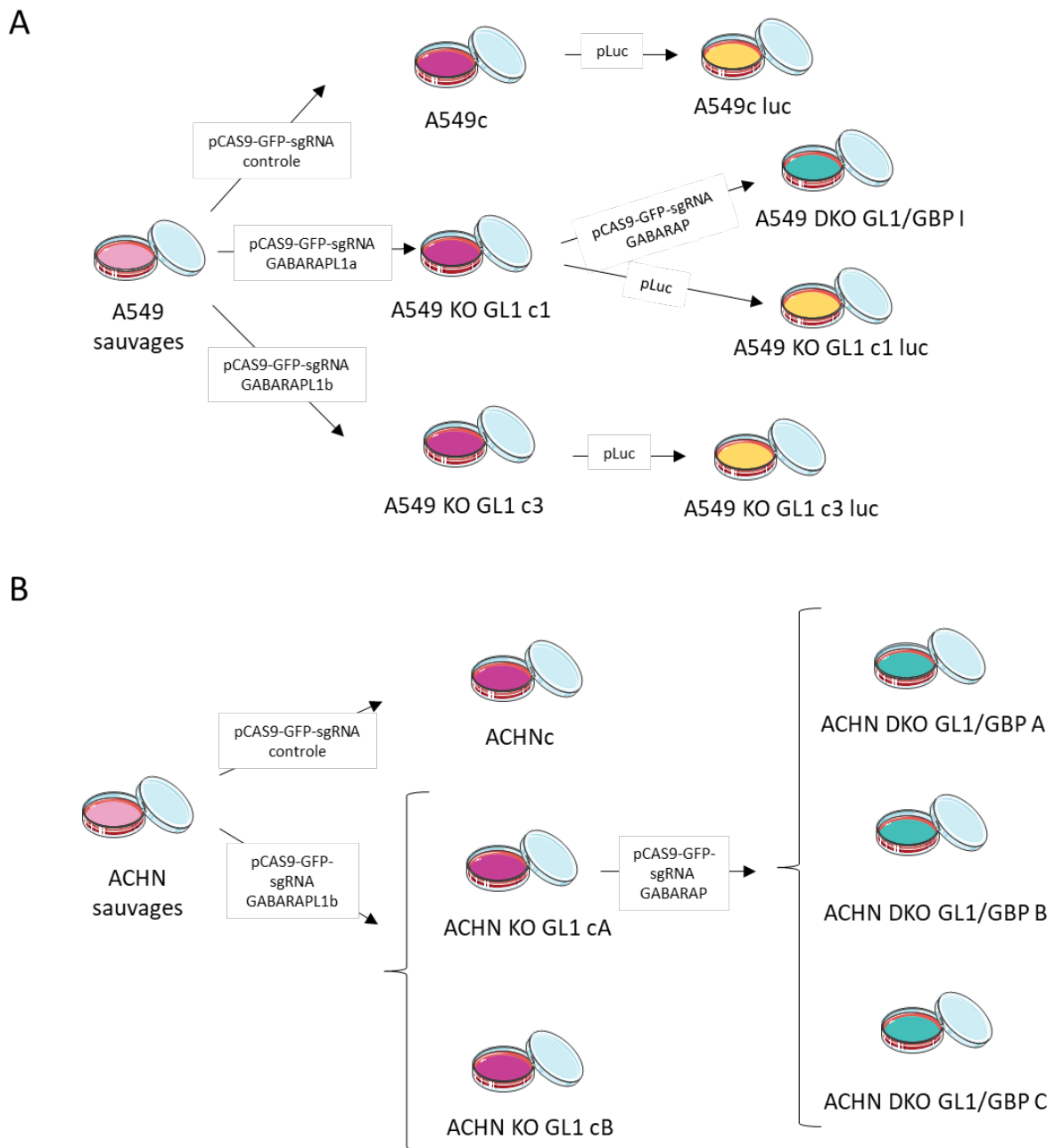


Figure 15 : Obtention des différentes lignées cellulaires A549c, KO GABARAPL1 (KO GL1), double KO GABARAPL1/GABARAP (DKO GL1/GBP), ACHN, KO GABARAPL1 (KO GL1), double KO GABARAPL1/GABARAP (DKO GL1/GBP par CRISPR/cas9). Obtention des lignées A549c luc et A549 KO GL1 luc par transduction.

1.2.3 ACHN et ACHN KO GABARAPL1 cA et cB

Cinq clones ACHN KO GABARAPL1 ont été obtenus : ACHN KO GL1 cA1, H1, N1, S et W. Ils proviennent tous de la transfection par le plasmide pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1b. Pour la suite de notre étude, les clones ACHN KO GL1 H1 et W ont été sélectionnés et ont été renommés cA et cB respectivement (Figure 15).

1.2.4 Séquençage des mutations introduites par CRISPR/Cas9

Le séquençage de l'ADN génomique des cellules A549c, KO GABARAPL1 c1 et c3, ACHNc, ACHN KO GABARAPL1 cA et cB ont permis d'identifier les mutations introduites.

Pour les cellules A549, 2 allèles différents de GABARAPL1 ont été identifiés. Pour chacun des clones KO GL1 un allèle resterait 100% identique à l'ADN génomique des cellules A549c. Le second allèle posséderait l'insertion d'un G pour le clone A549 KO GL1 c1, la délétion de 7 pb pour le clone A549 KO GL1 c2 et la délétion d'un G pour le clone A549 KO GL1 c3. Ces trois mutations aboutiraient à la formation d'un codon stop prématuré et donc à la production d'une protéine tronquée.

Pour les cellules ACHN, seuls les clones ACHN KO GL1 cA et cB ont été séquencés. Comme pour les cellules A549, 2 allèles différents ont été trouvés en revanche aucun n'est identique à l'ADN génomique des cellules ACHNc. Toutefois, de manière surprenante les deux clones ACHN KO GL1 cA et cB possèderaient des mutations identiques : sur l'un des allèles, il y a eu l'insertion d'un A et sur l'autre allèle la délétion d'un A. Ces deux mutations aboutissent à la formation d'un codon stop prématuré aboutissant ainsi à la production de protéines tronquées.

La production de protéines tronquées n'est qu'hypothétique puisqu'il est décrit dans la littérature que l'insertion de mutations au sein de l'ADN génomique conduit à la production d'ARN messagers aberrants ainsi rapidement dégradés par la cellule ne permettant pas la production de la protéine GABARAPL1.

1.3. A549c luc, KO GABARAPL1 c1 luc et c3 luc

Afin d'étudier la formation des métastases *in vivo* lors de l'injection des cellules A549c, KO GABARAPL1 c1 et c3, les cellules ont été transduites afin d'exprimer la luciférase (Figure 15) et permettre un suivi des métastases au cours du temps par luminescence sans sacrifice des souris.

De la rétronectine a été « coatée » dans une plaque 24 puits à 1,2 µg/cm² dans du PBS pendant une nuit à 4°C. Le surnagent lentiviral a été mis en contact de la rétronectine et une spin transduction a été effectuée pendant 1 h 30 à 2000 rpm à 10 °C. Les cellules A549c, KO GABARAPL1 c1 et c3 ont ensuite étéensemencées à raison de 20 000 cellules/cm² par puits. Le lendemain, le milieu de transduction a été remplacé par du milieu complet supplémenté de l'antibiotique blasticidine 10 µg/ml pendant 15 jours. Quelques cellules résistantes ont étéensemencées en 24 puits, la luciférine a été ajoutée pendant 3 min puis une lecture de la plaque a été réalisée sur le bioimager IVIS.

1.4.A549 DKO I GABARAPL1/GABARAP (DKO GL1/GBP) et ACHN DKO GABARAPL1/GABARAP A et B (DKO GL1/GBP A et B)

Les cellules A549 KO GL1 c1 et ACHN KO GL1 cA ont été transfectées (voir paragraphe 1.4. Transfection cellulaire) par un « pool » de 3 plasmides GABARAP CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h2) (sc-416746-KO-2, Santa Cruz). Comme pour l'obtention des lignées KO GL1, suite à la transfection, les cellules ont été triées puis remises en culture. De nombreux clones ont été prélevés, amplifiés puis l'expression de GABARAP a été testée par Western blot.

Pour les cellules A549, un unique clone double KO GABARAPL1/GABARAP I (DKO GL1/GBP I) a été obtenu. Pour les cellules ACHN, 3 clones DKO GL1/GBP ont été obtenus : ACHN DKO GL1/GBP A, ACHN DKO GL1/GBP B et ACHN DKO GL1/GBP C (Figure 15). L'utilisation d'un pool de trois plasmides CRISPR/Cas9 ciblant des zones différentes du gène GABARAP n'a pas permis le séquençage des différentes mutations introduites.

Les lignées A549 et ACHN DKO GL1/GBP ont été de nouveau transfectées par un pool de 3 plasmides GABARAPL2 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h2) (sc-403558-KO-2, Santa Cruz) afin d'obtenir des lignées triple KO GABARAPL1/GABARAP/GABARAPL2. Toutefois, peu de clones ont été obtenus suite au tri cellulaire et aucun ne présentait la triple extinction.

2. Entretien des cellules

Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide 5% CO₂ et entretenues deux fois par semaine. Pour cela, le surnageant de culture a été éliminé, les cellules ont été rincées avec 8 ml de Hank's puis incubées avec 2 ml de trypsine-EDTA 1X, 5 min à 37 °C. La trypsine a été inactivée par ajout de 8 ml de milieu complet. La quantité de cellules souhaitée a étéensemencée dans 10 ml de milieu complet dans une nouvelle boîte.

3. Congélation et décongélation

Pour la congélation, des cellules en phase exponentielle de croissance ont été trypsinées puis reprises dans 10 ml de milieu complet. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 600 *g* puis le culot cellulaire a été remis en suspension dans 2 ml de milieu de congélation (90% milieu complet et 10% DMSO). Le cryotube contenant la suspension cellulaire a été placé une nuit à -80 °C dans une boîte contenant de l'isopropanol permettant d'abaisser la température progressivement puis dans l'azote liquide pour un stockage à long terme.

Pour la décongélation, le cryotube a été réchauffé rapidement à 37 °C puis la suspension cellulaire a été reprise dans 10 ml de milieu complet préalablement chauffée pour être centrifugée. Le

culot cellulaire a été remis en suspension dans du milieu complet puis placé dans une boîte de culture cellulaire de 75 cm². Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé par du milieu neuf.

4. Transfection cellulaire

4.1. Transfection réactif Jetprime

Lors de la transfection des cellules A549, ACHN, le réactif Jetprime (Polyplus Transfection) a été utilisé.

Pour la réalisation des lignées A549 et ACHN KO GABARAPL1 et double KO GABARAPL1/GABARAP, les cellules ont étéensemencées à raison de 20 000 cellules/cm² en plaque 6 puits. Le jour suivant, les cellules ont été transfectées avec 2 µg des différents plasmides CRISPR/Cas9, 200 µl de tampon Jetprime et 2 µl de Jetprime selon les recommandations du fournisseur. Après une nuit de transfection, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet.

Pour les expériences de microscopie confocale, les cellules ont étéensemencées à raison de 20 000 cellules/cm² en plaque 24 puits sur des lamelles de verre. Le jour suivant les cellules ont été transfectées avec 0,5 µg de plasmide pRFP-GFP-LC3 (137624, Addgene) dans 50 µl de tampon Jetprime et 1 µl de Jetprime selon les recommandations du fournisseur. Après 4 h d'incubation à 37 °C avec les complexes ADN-Jetprime, le milieu a été remplacé puis les cellules ont été placées 24 h à 37 °C avant de réaliser les différents traitements. Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie confocale (Zeiss LSM 800 AiryScan).

Pour les expériences de Western blotting ou de RT-qPCR, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 20 000 cellules/cm², transfectées (pCDNA3.1 Flag-GABARAPL1-6His, Flag-GABARAPL-G116A-6His et Flag-GABARAP) le jour suivant puis récoltées 24 h après la transfection.

4.2. Transfection réactif mirus TransiT[®]-2020

Les cellules BT474 ont été transfectées par le réactif mirus TransiT[®]-2020 Transfection Reagent (MIR 5400). Les cellules ont étéensemencées à raison de 20 000/cm² en pétri 10 cm. Le lendemain, le milieu de culture a été changé puis, 10 µg de plasmide (pCDNA3.1 Flag-GABARAPL1-6His, Flag-GABARAPL-G116A-6His) ont été mélangés dans 1,5 ml de milieu sans sérum ni antibiotique. Puis, 45 µl de réactif TransiT[®]-2020 ont été ajoutés. Après avoir homogénéisé le mélange par aspiration et refoulement, et incubé à température ambiante pendant 30 min, les complexes formés ont été ajoutés sur les cellules. Après une nuit de transfection, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet. Puis, après 4h, les cellules ont été de nouveauensemencées à raison de 20 000 cellules/cm²

dans les plaques appropriées pour réaliser les différentes expériences d'invasion, de Western blotting et de prolifération.

5. Tri cellulaire

Les cellules A549 et ACHN ont été triées suite à leur transfection par les différents plasmides CRISPR/Cas9 (Voir paragraphe I.1.2.1. Technologie CRISPR/Cas9) sur l'expression de la GFP afin de remettre en culture uniquement les cellules transfectées.

Les cellules ont été préalablementensemencées en plaque 6 puits à raison de 200 000 cellules par puits, puis transfectées avec les plasmides CRISPR/Cas9 codant aussi pour la GFP. Le lendemain de la transfection, les cellules ont été décollées par ajout de 500 µl de trypsine, puis reprises dans du milieu complet. Après une centrifugation de 5 min à 800 g, le culot cellulaire a été repris dans du PBS-0,03% EDTA puis maintenu sur glace jusqu'au tri. Après passage au trieur SONY, les cellules positives ont été récoltées dans un milieu très riche en SVF (1 ml de milieu complet pour 2 ml de SVF). Les cellules triées ont été remises en culture à raison de 5000 cellules par boîte de 10 cm de diamètre.

6. Traitements chimiques des cellules

6.1. Etude de l'autophagie

L'autophagie est un processus dynamique au cours duquel des autophagosomes sont produits puis dégradés. Afin d'étudier le flux autophagique, c'est-à-dire la vitesse de production et de dégradation des autophagosomes, il est possible soit d'étudier par Western blotting un marqueur des autophagosomes : la protéine LC3B, soit d'étudier la formation des vésicules autophagiques *via* l'utilisation d'un plasmide d'expression pGFP-RFP-LC3 permettant la discrimination des autophagosomes des autolysosomes.

Lors de l'étude du flux autophagique par Western blotting, une augmentation du nombre de vésicules autophagiques à un instant donné peut rendre compte d'une diminution de la dégradation autophagique ou d'une augmentation de l'induction c'est pourquoi il est nécessaire de quantifier le nombre de vésicules en présence et en absence d'inhibiteurs de la dégradation autophagique. Pour inhiber la dégradation autophagique le NH₄Cl a été utilisé empêchant l'acidification des lysosomes et donc la dégradation autophagique. Pour induire l'autophagie la rapamycine (15C27-MM, InvivoGen) a été utilisée. La rapamycine est un inhibiteur de MTOR, un inducteur connu de l'autophagie (**Tableau 3**). D'autres inducteurs et inhibiteurs de l'autophagie ont été utilisés et sont détaillés dans la partie matériels et méthodes de la **Publication I**.

6.1.1 Etude de la protéine LC3B par Western blotting

La protéine LC3B est un marqueur des autophagosomes. Au cours de l'autophagie, la protéine LC3B soluble est clivée puis conjuguée à un phospholipide afin d'intégrer la membrane des autophagosomes. La quantité de LC3B conjuguée (LC3B-II) est ainsi proportionnelle au nombre d'autophagosomes dans la cellule. Elle est donc étudiée par Western blotting en présence ou en absence d'inducteur et d'inhibiteur de l'autophagie.

6.1.2 Etude des vésicules autophagiques par transfection pGFP-RFP-LC3

Les cellules A549 ont étéensemencées sur lamelle de verre en plaque 24 puits à raison de 20 000 cellules/cm². Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pGFP-RFP-LC3 selon le protocole Jetprime comme décrit dans le paragraphe I.4. Transfection cellulaire. Le jour suivant, les différents traitements ont été réalisés. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS 1X froid puis fixées pendant 15 min au PFA 4% (p/v). Les cellules ont ensuite été montées sur lame avec du milieu de montage (F4680 Fluoromount, Sigma Aldrich) et observées au microscope.

6.2. Etude de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse

Afin d'induire la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) dans les cellules A549 et ACHN, un co-traitement TGFβ/TNFα a été utilisé (**Tableau 3**). Le TGFβ (100-21, Peprotech) est l'inducteur de la TEM et le TNFα (300-01A, Peprotech) a été décrit comme permettant de potentialiser les effets du TGFβ, permettant ainsi l'utilisation de concentration moindre de TGFβ et donc de limiter sa toxicité cellulaire.

6.3. Autres traitements utilisés

Un inhibiteur du protéasome, le bortezomib a aussi été utilisé, il permet l'inhibition de la sous unité β5 du protéasome (**Tableau 3**).

Composé	Concentration	Durée (h)
Rapamycine	10 μM	4
Bortezomib	100 à 200 nM	6 à 15
TGFβ/TNFα	5 ng/mL et 20 ng/mL	2 à 48
NH ₄ Cl	50 mM	2

Tableau 3 : Concentrations et durées des traitements utilisés

II. Analyse des protéines

1. Extraction des protéines

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

- a) Les cellules ont été rincées avec du PBS froid, puis elles ont été collectées mécaniquement à l'aide d'un grattoir et centrifugées (5 min, 600 g, 4 °C). Les culots cellulaires obtenus ont été repris dans 7,5 µl de tampon RIPA [Tris-HCl 10 mM pH 7,4 NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, Triton X-100 1% (v/v), NaDOC 0,5% (p/v), SDS 0,1% (p/v)] pour 100 000 cellules environ, additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich), ont été soniqués 5s sur glace et incubé 20 min sur glace. Les protéines ont ensuite été dosées par la technique de Bradford. A la quantité de protéine souhaitée a été ajouté le tampon de charge 1X [Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glycérol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β-mercaptoéthanol 5% (v/v), bleu de bromophénol 0,02% (p/v)].
- b) Les cellules ont été collectées comme précédemment et ont été lysées par ajout de 10,5 µl de tampon de charge 1X [Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glycérol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β-mercaptoéthanol 5% (v/v), bleu de bromophénol 0,02% (p/v)] pour 100 000 cellules environ. Les cellules ont été soniquées 5 sec sur glace

Les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Western blot

Les échantillons protéiques ont été dénaturés 5 min à 95°C avant d'être chargé sur un gel d'acrylamide TGX (1610172, BioRad). La migration a été effectuée dans un tampon d'électrophorèse [Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1% (v/v)] pendant environ 10 min à 100 V puis 20 min à 300 V.

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (1704157, BioRad) avec le Transblot turbo (1704150, Biorad) en suivant les recommandations du fournisseur. Les sites de fixations non spécifiques ont été saturés dans un tampon TBS-T ([Tris-HCl 199 mM pH 7,4, NaCl 0,35 M, Tween 20 0,1% (v/v)] supplémenté de 5% Régilait ou BSA (Bovine serum albumin) pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Les membranes ont ensuite été incubées une nuit, sous agitation avec l'anticorps primaire (**Tableau 4**). Après trois lavages de 10 min dans une solution de TBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans une solution de TBS-T 5% régilait. Trois nouveaux lavages ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment puis les protéines ont été révélées par chimioluminescence. Les membranes ont été recouvertes de 1 ml d'ECL (1705060, Biorad) pendant 5 min à l'abri de la lumière puis analysées à l'aide du Chemidoc XRS+ (Biorad).

Anticorps	Dilution	Références
PRIMAIRES		
LC3	1/3000	LB8918, Sigma
GABARAPL1	1/1000	11010-1-AP, proteintech
GABARAP/L1	1/2000	AB15278, Chemicon Millipore
GABARAPL2	1/1000	18724-1-AP, Proteintech
ULK1	1/1000	D8H5, Cell Signaling
pULK1 ser 555	1/1000	D1H4, Cell Signaling
pULK1 ser 757	1/1000	D7O6U, Cell Signaling
Actine	1/10 000	A5060, Sigma Aldrich
N-Cadhérine	1/1000	D4R1H, Cell Signaling
E-Cadhérine	1/1000	610181, BD Biosciences
SNAI1	1/1000	C15D3, Cell Signaling
SMAD 2	1/1000	5339T, Cell Signaling
SMAD 3	1/1000	9523T, Cell Signaling
SMAD 4	1/1000	38454T, Cell Signaling
TWIST	1/1000	GTX127310, GeneTex
β-caténine	1/1000	D10A8, Cell Signaling
SECONDAIRES		
Anti IgG de souris HRP conjugué	1/10 000	BI2413C, Paris Anticorps
Anti IgG de lapin HRP conjugué	1/10 000	BI2407, Paris Anticorps

Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines en Western-blotting

3. Etude des cellules par microscopie confocale

3.1. Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle de verre en plaque 24 puits à raison de 20 000 cellules/cm². Le lendemain, suite aux différentes stimulations, les cellules ont été rincées par du PBS 1X froid puis fixées pendant 15 min au PFA 4% (p/v). Après rinçage au PBS, les cellules ont été perméabilisées 5 min au PBS-Triton X100 0,1% (v/v) et rincées au PBS. Les sites aspécifiques ont été saturés pendant 30 min à température ambiante par ajout d'une solution de PBS-BSA 5%. L'anticorps primaire a été dilué dans une solution de PBS-BSA 1% puis incubé une nuit à 4 °C (**Tableau 5**).

Anticorps	Dilution	Référence
PRIMAIRES		
SMAD 2	1/200	5339T, Cell Signaling
SMAD 3	1/200	9523T, Cell Signaling
SECONDAIRES		
Anti IgG de lapin Alexa fluor 488	1/500	A-11008, Life technologies

Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection de protéines par immunofluorescence

Le lendemain, les cellules ont été rincées rapidement avant d'être incubées 1 h à 37 °C en présence de l'anticorps secondaire dilué dans une solution PBS-BSA 1%. Les noyaux ont ensuite été marqués au DAPI (1/5000) puis les cellules ont été rincées trois fois avant d'être montées sur lame avec du milieu de montage (F4680 Fluoromount, Sigma Aldrich) et observée au microscope.

3.2. Transfection transitoire de protéines fluorescentes

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle à raison de 20 000 cellules/cm² en plaque 24 puits puis ont été transfectées 4h par le pRFP-GFP-LC3. Le lendemain, les cellules ont été rincées par du PBS froid et fixées 15 min au PFA 4%. Les noyaux ont été marqués au DAPI et suite à trois rinçages, les lames ont été montées.

3.3. Marquage des cellules à la phalloïdine

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle à raison de 20 000 cellules/cm² en plaque 24 puits. Le lendemain après avoir subi les différents traitements, les cellules ont été rincées par du PBS froid et fixées 15 min au PFA 4%. Les cellules ont ensuite été marquées par la phalloïdine couplée à la rhodamine pendant 10 min à température ambiante. Les noyaux ont été marqués au DAPI puis après trois rinçage, les lames ont été montées.

III. Analyse des ARN totaux

1. Extraction des ARN totaux

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de 20 000 cellules/cm². Après la réalisation des différents traitements, les cellules ont été rincées avec du PBS froid. La lyse a été réalisée par l'ajout de 1 mL de tampon de lyse (TRI Reagent®, molecular Research Center, Inc.). Suite à l'ajout de 200 µl de chloroforme, les tubes ont été agités fortement et ont été incubés 10 min à température ambiante. Suite à une centrifugation (15 min, 12 000 g, 4 °C), la phase supérieure a été prélevée puis les ARN ont été précipités par l'ajout de 500 µl d'isopropanol glacé. La solution a été mélangée par

Vortex puis a été incubée 10 min à température ambiante avant d'être centrifugée dans les mêmes conditions. Le culot ainsi obtenu a été rincé avec une solution glacée d'éthanol 70%, puis a été séché avant d'être repris dans 20 µl d'eau ultra pure puis dissocié par chauffage 5 min à 65 °C. Les ARN ont été conservés à -80°C.

Les ARN totaux ont été purifiés par l'ajout de 1 U/µl de DNase I (ThermoFischer) permettant d'éliminer l'ADN restant. Après une incubation de 30 min à 37°C, l'enzyme a été inactivée par ajout d'EDTA 1 mM et d'une incubation à 65 °C pendant 10 min.

2. Réverse transcription

Les ARN totaux ont ensuite été soumis à une reverse transcription. Pour cela, 1 à 2 µg d'ARN totaux, 1 µM d'amorce oligodT(17) et 1 mM de dNTP ont été mélangés dans un volume final de 17,5 µl puis incubés 10 min à 70 °C. Le tampon de l'enzyme et 100 U de reverse transcriptase (M-MLV Reverse Transcriptase, Sigma) ont été ajoutés dans un volume final de 20 µl. Le mélange a été placé 10 min à 25°C puis 1 h 30 à 37 °C. L'enzyme a été inactivé par chauffage à 87 °C pendant 10 min. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20 °C.

3. Analyse par PCR en temps réel

Les ADNc ont été amplifiés par PCR en temps réel (q-PCR) grâce à la méthode Syber Green (Takara). A 10 µl du mélange SYBR Premix Ex Taq 2X ont été ajoutés 0,5 mM de chaque amorce sens et anti-sens (**Tableau 6**) et 8 µl de matrice diluée au 1/80 ou 8 µl d'eau pour les contrôles négatifs dans un volume final de 20 µl. L'appareil « StepOne » (Applied Biosystem) a été utilisé pour l'amplification selon le protocole suivant : dénaturation initiale et activation de la polymérase à 95 °C pendant 10 minutes, amplification à 95 °C pendant 15 secondes puis à 60 °C pendant 1 minute (40 cycles). L'analyse des résultats a été réalisée selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001).

ADNc	Amorces	Séquence
H3B2	His I	GCTAGCTGGATGTCTTTTGG
	His N	GTGGTAAAGCACCCAGGAA
SMAD 2	SMAD2 Sens	ACCGAAATGCCACGGTAGAA
	SMAD2 rev	TGGGGCTCTGCACAAAGAT
SMAD 3	SMAD3 Sens	GCCTGTGCTGGAACATCATC
	SMAD3 rev	TTGCCCTCATGTGTGCTCTT
SMAD 4	SMAD4 Sens	CATCCTGCTCCTGAGTATTGG
	SMAD4 rev	GGGTCCACGTATCCATCAAC
SNAI1	SNAI1-F	CGCGCTCTTCTCGTCAG

	SNAI1-R	TCCCAGATGAGCATTGGCAG
CDH2	CDH2-R	CTCATATGGTGGAGCTGTGGC
	CDH2-F	TGTGGGAATCCGACGAATG
CDH1	CDH1-R	AGGATGGTGTAAAGCGATGGC
	CDH1-F	CGGGAATGCAGTTGAGGATC
LC3B	Hum LC3-sens-qpcr	CGGAAAGCAGCAGTGTACCA
	Hum LC3-rev-qpcr	GGCAGAAGGGAGTGTGTCTGA
GABARAP	humgabarap-sens-qpcr	GCCTTTCCCATCCTGCTGTA
	humgabarap-rev-qpcr	AGGAAGGGATTGCTGGGTTCT
GABARAPL1	humgec1sens-qpcr	CCCTCCCTTGTTATCATCCA
	humgec1rev-qpcr	ACTCCCACCCACAAAATCC
GABARAPL2	ATG16L2-F-Hs	TAGTGGCCACAATGACCAGA
	ATG16L2-R-Hs	TGAACACAGCTTTGGTCCAG

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR en temps réel

IV. Etude des phénotypes cancéreux *in vitro*

1. Test de prolifération cellulaire : test MTT

Le test MTT consiste en l'estimation du nombre de cellules vivantes grâce à la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par les déshydrogénases mitochondriales de ces cellules.

Les cellules BT474, A549 et ACHN ont étéensemencées en plaque 96 puits à raison de 3000, 1500 et 1000 cellules par puits respectivement. Le jour suivant, le milieu a été éliminé et remplacé par le MTT à 100 mM dans une solution saline de Hank's à raison de 100 µL par puits. Après une incubation de 2 h à 37°C, les plaques ont été centrifugées (5 min, 300 g) et le MTT a été éliminé par retournement de la plaque sur du papier absorbant. Les cristaux de formazan ainsi formés ont été solubilisés par ajout de 50 µL de DMSO dans chaque puits. La quantité de cellules vivantes a alors été estimée par la mesure de l'absorbance à 549 nm et 620 nm grâce à un spectrophotomètre lecteur de plaques (Multiskan FC, ThermoScientific).

2. Test de migration et d'invasion en chambre de Boyden

2.1. Migration cellulaire

L'étude de la migration cellulaire a été réalisée en chambre de Boyden (SPL Life Science, diamètre 6,5 mm, pores de 8µm). Les cellules BT474 ont étéensemencées dans le compartiment supérieur à raison de 100 000 cellules par insert dans 250 µL de milieu sans SVF. Dans le compartiment

inférieur, 500 µl de milieu complet ont été placés. Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère 5% CO₂ les cellules ont été fixées à l'éthanol 100% pendant 5 min. Les cellules n'ayant pas traversé la membrane ont été éliminées par grattage et les cellules ayant traversé ont été colorées au crystal violet 0,5% (p/v) éthanol 2% (v/v) pendant 10 min. L'excès de colorant a été éliminé par des lavages successifs à l'eau distillée. Les cellules marquées sont les cellules ayant traversé la membrane, elles ont été comptées à raison de 10 champs par chambre de Boyden au microscope inversé à un grossissement de X400.

2.2. Invasion cellulaire

L'étude de l'invasion cellulaire a été réalisée en chambre de Boyden (SPL Lige Science, diamètre 6,5 mm, pores de 8 µm). Le compartiment supérieur a été préalablement tapissé de 1 mg/ml de Matrigel (Sigma Aldrich) dans 50 µl milieu dépourvu de SVF. Les inserts ont été placés pendant 7 heures à 37°C. Les cellules A549c, KO GABARAPL1 c1 et c3 ont ensuite étéensemencées à raison de 100 000 cellules par insert dans 250 µl de milieu sans SVF. Après 24 h d'incubation à 37°C et 5% CO₂ les cellules ayant traversé la membrane ont été fixées, puis marquées et comptées comme décrit précédemment (Cf. paragraphe IV 2.1. Migration cellulaire).

V. Etude de la formation des métastases *in vivo*

Les cellules A549c luc, KO GL1 c1 luc et KO GL1 c3 luc ont été trypsinées, puis reprises dans du milieu complet. Une solution de 4.10⁶ cellules dans 300 µl de PBS ont été injectées dans la veine de la queue de souris SCID (Janvier Labs). Le suivi de la bioluminescence a été réalisée par l'injection de luciférine D en intrapéritonéale. Cinq min après l'injection, la lumière émise par les tumeurs a été détectée et quantifiée avec le live imager IVIS.

VI. Clonage plasmidique

Afin de réaliser le séquençage de l'ADN génomique des différentes lignées cellulaires, l'ADN a été extrait des cellules A549c, A549 KO GABARAPL1 c1 et c3, ACHNc et ACHN KO GABARAPL1 cA et cB grâce au kit NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel) selon le protocole du fournisseur. Des amorces permettant de cibler environ 100 pb avant et après la zone de fixation de chaque ARN guide ont été dessinées (Tableau 5) et une PCR avec une DNA polymérase haute-fidélité a été réalisée. Les amplicons obtenus ont été clonés dans des vecteurs pJET1.2 puis une transformation bactérienne a été réalisée. Pour chaque clonage, 6 colonies ont été prélevées. L'ADN plasmidique a été extrait par le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur et séquencé.

1. PCR ADN polymérase Phusion High-Fidelity

Le mélange réactionnel de PCR a été réalisé de la manière suivante : 1X Phusion HF buffer, 200 μ M dNTP, 0,5 μ M de chaque primer (**Tableau 7**), 200 ng de matrice ADN et 0,002 U/ μ l de Phusion DNA Polymérase. La dénaturation initiale a été réalisée à 98 °C pendant 30 secondes, puis 30 cycles ont été réalisés de la manière suivante : dénaturation 10 secondes à 98 °C, appariement 30 secondes à 65 °C et extension 30 secondes à 72 °C. Une extension finale de 5 minutes a été réalisée à 72 °C.

Zone a séquencée/Cellules	Amorces	Séquence
Début exon 1/A549 KO GL1 1	Début exon 1 (a) sens	CGGTGCATCATGAAGTTCCA
	Début exon 1 (a) rev	CTCCGCTCCTCTACTACTAC
Fin exon 1/A549 KO GL1 c3, ACHN KO GL1 cA et cB	Fin exon 1 (b) sens	GCCCTGCGGTGCATCAT
	Fin exon 1 (b) rev	CATCCCCTCCGCTCCTCTACTACT
Exon 2/A549 KO GL1 c2	Exon 2 (c) sens	TCATTCCTACTCTCCTCTCTTCT
	Exon 2 (c) rev	GAGGAAGGGTCAGGGAAGG

Tableau 7: Séquence des amorces utilisées pour le séquençage des différentes lignées KO GABARAPL1

Les produits de PCR ont ensuite été purifiés par NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (740609, Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

2. Clonage dans un vecteur pJET

Les produits de PCR purifiés ont été ligaturés dans un vecteur pJET1.2 dans un ratio 3 :1. Les produits de PCR ont été mélangés avec 50 ng du vecteur pJET1.2 en présence de 1 μ l de T4 DNA ligase dans le tampon réactionnel 1X Reaction Buffer. Le mélange a été incubé 5 minutes à température ambiante et la transformation bactérienne a été réalisée.

3. Transformation et culture bactérienne

Pour la transformation bactérienne, 50 ng de vecteur pJET1.2 ligaturé avec les produits de PCR ont été ajoutés sur 50 μ l de bactéries compétentes et incubés sur glace pendant 20 minutes. Suite à un choc thermique de 2 minutes à 42 °C puis de 2 minutes sur glace, 800 μ l de milieu LB ont été ajoutés. Le mélange a été placé sous agitation pendant 1 h à 37 °C puis centrifugé 10 minutes, 5000 g à température ambiante. Le culot bactérien a été repris dans 50 μ l de milieu LB puis étalé sur boîte LB agar ampicilline. Après une nuit à 37 °C, les colonies bactériennes ont été prélevées puis les mini-cultures ont été réalisées dans un milieu LB 1X ampicilline. Après une journée d'incubation à 37°C sous agitation, les plasmides ont été extraits par miniprep sur colonne NucleoSpin® Plasmid (740588, Macherey Nagel) puis ont été séquencés.

RESULTATS

I. Etude du rôle de GABARAPL1 dans la carcinogenèse

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie et dans le cancer avec un focus sur la TEM.

Le gène *GABARAPL1*, a été initialement identifié comme étant positivement régulé par les œstrogènes au sein de notre laboratoire au début des années 1990 chez le cochon d'inde (Pellerin et al., 1993). Il code une protéine de 117 acides aminés qui est impliquée dans le transport du récepteur GABA_A et qui possède en N-terminal un domaine de liaison à la tubuline (Vernier-Magnin et al., 2001). GABARAPL1 possède une forte identité de séquence avec GABARAP et GABARAPL2 suggérant que ces protéines appartiennent à une même sous-famille, les protéines GABARAP et à la famille ATG8. L'orthologue ATG8 chez la levure a été identifié comme impliqué dans le processus d'autophagie (Lang et al., 1998) ce qui est également le cas des protéines ATG8 des mammifères qui sont localisées au niveau de la membrane des autophagosomes (Chakrama et al., 2010; Kabeya et al., 2004). Les protéines de la sous-famille GABARAP, comme les protéines de la sous-famille LC3, possèdent une glycine en position C-terminale 116 pour les protéines GABARAP, permettant leur conjugaison aux membranes des autophagosomes. Suite à leur clivage par une protéase ATG4 en aval de cette glycine, les protéines ATG8 sont conjuguées à un phospholipide de la membrane des autophagosomes (Chakrama et al., 2010). Il a été initialement décrit que les protéines de la sous-famille GABARAP sont impliquées lors des étapes tardives de l'autophagie (Weidberg et al., 2010) mais également dans l'autophagie sélective par leur interaction avec des adaptateurs tels que p62 permettant ainsi l'élimination d'organites intracellulaires ou encore d'agrégats protéiques ubiquitinylés (Anding and Baehrecke, 2017).

La protéine GABARAPL1 a également été associée au cancer. En effet, une perte d'expression de *GABARAPL1* a été mise en évidence dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus sains (Nemos et al., 2003). Puis l'expression de *GABARAPL1* a été identifiée comme facteur de bon pronostic chez des patients atteints de cancer du sein (Berthier et al., 2010). Des études *in vitro* de surexpression de *GABARAPL1* dans des lignées cellulaires de cancers du sein et hépatocellulaires ont permis de confirmer le rôle de GABARAPL1 dans le cancer par son implication dans la diminution de la prolifération cellulaire ainsi que dans la diminution de la croissance tumorale *in vivo* (Liu et al., 2014; Zhang et al., 2011). L'ensemble de ces résultats ont donc suggéré un rôle suppresseur de tumeur de GABARAPL1.

L'autophagie et la carcinogenèse sont deux mécanismes étroitement liés. Lors des étapes précoces, l'autophagie permettrait d'inhiber la transformation tumorale, en revanche, dans les étapes plus tardives, l'autophagie permettrait un apport en nutriments aux cellules tumorales. Du fait de l'implication de GABARAPL1 dans l'autophagie et le cancer, nous avons voulu approfondir le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie puis étudier l'implication du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie dans

son rôle suppresseur de tumeur. Cette étude a été réalisée dans un modèle de cancer du sein MCF-7 surexprimant GABARAPL1 ou un mutant GABARAPL1-G116A possédant une alanine en position 116 à la place de la glycine nécessaire à sa localisation au niveau des autophagosomes. Les principaux résultats ont été confirmés dans un autre modèle de cancer du sein les cellules BT474. Les résultats de cette étude ont montré que :

- ✓ **La mutation G116A inhibe la lipidation de GABARAPL1 et donc sa localisation au niveau des autophagosomes sans perturber son interaction avec la tubuline**
- ✓ **La localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes est indispensable lors de l'autophagie induite mais pas lors de l'autophagie basale**
- ✓ **La localisation de GABARAPL1 au niveau des autophagosomes est indispensable lors des étapes tardives de l'autophagie**
- ✓ **GABARAPL1 possède également un rôle lors des étapes précoces de l'autophagie, rôle indépendant de sa localisation au niveau des autophagosomes.**
- ✓ **Le rôle de GABARAPL1 lors de l'étude des phénotypes cancéreux *in vitro* peut être dépendant ou indépendant de sa localisation au niveau des autophagosomes**
- ✓ **Le rôle de GABARAPL1 dans la croissance tumorale *in vivo* est indépendant de sa localisation au niveau des autophagosomes.**

L'ensemble de ces résultats est présenté dans la **Publication I (Poillet-Perez et al., 2017)**.

De plus, nous avons voulu étudier l'implication de GABARAPL1 dans les étapes tardives de la carcinogénèse telle que la TEM, largement décrite comme impliquée dans la formation des métastases. La TEM est un mécanisme qui a été décrit comme impliqué dans le cancer dans les années 1990 suite à l'étude de cellules de cancer du sein dont les propriétés d'invasion *in vitro* sont exacerbées du fait d'une forte expression de la Vimentine (Thompson et al., 1992). Puis, une diminution de l'expression de la E-Cadhérine a été décrite comme souvent accompagnée d'une augmentation de la N-Cadhérine, impliquée dans l'augmentation de la mobilité cellulaire (Nieman et al., 1999). Le rôle de la TEM dans la carcinogénèse a initialement été associé à son implication dans la formation des métastases, première cause de mortalité des patients atteints de cancer. Puis, par la suite, la TEM a également été associée à la résistance aux traitements et à l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015).

Le rôle de l'autophagie au cours de la TEM est complexe puisque l'autophagie permet la dégradation d'inducteurs de la TEM tel que le TGF β . Puis, l'autophagie sélective permet la dégradation d'acteurs de la TEM tels que les EMT-TFs inhibant ainsi la TEM (Catalano et al., 2015; Ding et al., 2014; Grassi et al., 2015; Lv et al., 2012; Qin et al., 2015). Toutefois, l'inhibition de l'autophagie a également

été décrite comme inhibant la TEM (Lu et al., 2015; Tong et al., 2018; Zhu et al., 2014; Zou et al., 2016). Bien que les mécanismes mis en jeu ne soient à ce jour que peu décrits, l'autophagie pourrait permettre l'élimination de protéines endommagées (Liu et al., 2017) permettant le maintien du métabolisme cellulaire nécessaire à la TEM. De plus, il a été décrit que ces deux voies ont des inducteurs et des voies de signalisation cellulaires communs (Kiyono et al., 2009; Mikaelian et al., 2013). Du fait de l'implication de GABARAPL1 dans la carcinogenèse et dans l'autophagie sélective, nous avons voulu approfondir le rôle de GABARAPL1 lors de la TEM. Cette étude a été réalisée dans deux modèles cellulaires inductibles en TEM par la voie du TGF β A549 (carcinome de poumon) et ACHN (carcinome de rein) dont le gène *GABARAPL1* a été invalidé par la technologie CRISPR/Cas9. Cette étude a permis de montrer que :

- ✓ **Les tumeurs de poumons en TEM ont une plus forte expression de GABARAPL1 que les tumeurs épithéliales**
- ✓ **L'induction de la TEM par le TGF β induit une forte expression de GABARAPL1**
- ✓ **L'invalidation de GABARAPL1 ne modifie pas le flux autophagique basal**
- ✓ **GABARAPL1 inhibe la TEM par son implication dans la dégradation des protéines SMAD induisant une inhibition de l'expression de SNAI1**
- ✓ **L'invalidation de GABARAPL1 conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'invasion *in vitro*.**

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

Au vu de l'implication de GABARAPL1 dans la carcinogenèse et de la potentielle redondance fonctionnelle du fait d'une forte homologie des membres de la famille ATG8, nous avons réalisé une étude bibliographique sur l'ensemble des membres de la famille ATG8 afin de déterminer s'ils pourraient être utilisés comme biomarqueur dans les cancers et de déterminer leur rôle dans la carcinogenèse. Dans cette étude bibliographique nous avons recensé de nombreuses études qui montrent que :

- ✓ **L'expression des membres de la sous-famille GABARAP apparait comme généralement diminuée dans les cancers par rapport aux tissus sains alors que l'expression des membres de la sous-famille LC3 apparait comme dépendant du type de tumeur**
- ✓ **Le rôle antitumoral des protéines ATG8 est généralement lié à leur implication dans la dégradation d'oncoprotéines par autophagie sélective mais pourrait également impliquer un rôle indépendant de leur lipidation.**

L'ensemble de cette étude est présenté dans la **Revue I (En révision, Autophagy)**.

Publication I :

**GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in
MCF-7 breast cancer cells**

Laura Poillet-Perez, **Marine Jacquet**, Eric Hervouet, Thierry Gauthier, Annick fraichard, Christophe Borg, Jean-René Pallandre, Bruno J. Gonzalez, Yasmina Randani, Michaël Boyer-Guittaut, Régis Delage-Mourroux and Gilles Despouy

Oncotarget (2017)

GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells

Laura Poillet-Perez^{1,3,*}, Marine Jacquet^{1,*}, Eric Hervouet¹, Thierry Gauthier¹, Annick Fraichard¹, Christophe Borg¹, Jean-René Pallandre¹, Bruno J. Gonzalez², Yasmina Ramdani², Michaël Boyer-Guittaut¹, Régis Delage-Mourroux¹ and Gilles Despouy¹

¹ Unité Mixte de Recherche, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur, Ingénierie Cellulaire et Génique, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

² Microvascular Endothelium and Neonatal Brain Lesions, Université de Normandie, UFR de Médecine et de Pharmacie, Rouen, France

³ Rutgers Cancer Institute of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, USA

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Gilles Despouy, email: gilles.despouy@univ-fcomte.fr

Keywords: autophagy, breast cancer, GABARAPL1, LC3, MCF-7

Received: August 02, 2016

Accepted: July 18, 2017

Published: July 27, 2017

Copyright: Poillet-Perez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The GABARAPL1 protein belongs to the ATG8 family whose members are involved in autophagy. Our laboratory previously demonstrated that GABARAPL1 associates with autophagic vesicles, regulates autophagic flux and acts as a tumor suppressor protein in breast cancer. In this study, we aimed to determine whether GABARAPL1 conjugation to autophagosomes is necessary for its tumor suppressive functions using the MCF-7 breast cancer cell line overexpressing GABARAPL1 or a G116A mutant, which is unable to be lipidated and associated to autophagosomes. We show that the G116A mutation impaired GABARAPL1 function in autophagosome/lysosome fusion and inhibited lysosome activity but did not alter MTOR and ULK1 activities or tumor growth *in vivo*. Our results demonstrate for the first time that GABARAPL1 plays different regulatory functions during early and late stages of autophagy, independently or not of its conjugation to autophagosomes, but its tumor suppressive function appeared to be independent of its conjugation to autophagic vesicles.

INTRODUCTION

Macroautophagy (hereafter called autophagy) is a cellular degradation process in which damaged proteins, organelles and other cytoplasmic constituents are degraded and recycled to provide nutrients and energy [1, 2]. This process is characterized by the engulfment of portions of the cytosol, soluble proteins and/or organelles into a unique double-membrane structure called the phagophore. The phagophore elongates and closes to generate a double-membrane organelle called the autophagosome which then fuses with the lysosome to form the autophagolysosome, leading to the degradation of its content by lysosomal hydrolases [3, 4]. This mechanism occurs at low basal levels to maintain cellular homeostasis but can be induced

by different stresses such as hypoxia or nutrient starvation to allow cell survival. These stresses induce different signaling pathways involving MTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex), an autophagy inhibitor, or AMPK (AMP-activated protein kinase), an inducer of autophagy. MTORC1 and AMPK then phosphorylate the same protein called ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1), the yeast homolog of Atg1, to modulate autophagy following nutrient or energy starvation. During nutrient-rich conditions, MTORC1 associates with the ULK1 complex and inhibits autophagy through the phosphorylation of ULK1 at Ser 757. Nutrient starvation leads to the inhibition of MTORC1, activation of ULK1 and subsequent induction of autophagy [5, 6]. During nutrient or energy starvation, AMPK can inhibit MTORC1 and activate ULK1 through phosphorylation

at Ser 317, 555 and 777 leading to the induction of autophagy [7-9].

The autophagy process is mediated by more than 30 autophagy-related (ATG) proteins. Among these proteins, GABARAPL1/GEC1 (GABA_A receptor-associated protein-like 1/Glandular epithelial cells 1), which was first described by our group as an estrogen regulated gene, belongs to the ATG8 family [10], composed of 2 subfamilies the MAP-LC3 (microtubule-associated light chain-3) subfamily and the GABARAP subfamily. The latter includes GABARAPL1, GABARAP and GABARAPL2/GATE-16 (GABARAP like-2 protein/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa), which share 87% and 61% identity with GABARAPL1, respectively [11-13]. GABARAPL1 is composed of 117 amino acids and is involved in protein intracellular transport due to its interaction with the GABA_A receptor, the κ opioid receptor and TUBULIN [14, 15]. GABARAPL1 also interacts with HSP-90 (Heat shock protein 90) which prevents its degradation by the proteasome [16].

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

Despite their homology, GABARAP and LC3 subfamily members are suspected to be involved at different stages of the autophagic process. Indeed, the LC3 subfamily is thought to be necessary for the elongation of the phagophore whereas the GABARAP subfamily has been suggested to be necessary for the maturation of the autophagosome [24]. In a previous study, we demonstrated that a cellular knock-down of GABARAPL1 decreased autophagic flux and lysosome number in the breast cancer cell line MDA-MB-436 [25]. This knock-down also led to an increase in glutathione and ATP level, basal respiration and accumulation of damaged mitochondria, suggesting a function of GABARAPL1 in mitochondrial homeostasis and metabolic reprogramming. Moreover, GABARAPL1 has been shown to interact with AMPK (unpublished data) and ULK1 suggesting a potential involvement of this protein during the early stages of autophagy, as well [26, 27].

The ATG8 family is also involved in "selective autophagy" which targets defined cargos for degradation [28]. Cargo adaptor proteins interact with ATG8 proteins via their LIR motif (LC3-interacting region) to deliver ubiquitinated proteins or organelles to the autophagosomes for their degradation [29, 30]. For example, GABARAPL1

interacts with the cargo receptors SQSTM1 (sequestosome 1) or NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) to induce the degradation of ubiquitinated protein aggregates (cargos) and with NIX to activate the degradation of damaged mitochondria during the selective process called mitophagy [31-33].

Deregulation of autophagy is thought to be involved in various diseases including cancer [34]. However, autophagy presents a double edge-sword in cancer since it can act as a tumor-suppressing or a tumor-promoting process depending on tumor type and stage [35-37]. During the early stages of tumorigenesis, autophagy acts as a tumor suppressor mechanism by limiting DNA damage, chromosome instability, oxidative stress and inflammation which are oncogenic stimuli [38, 39]. Moreover, the expression of proteins involved in autophagy such as BECN1 (BECLIN-1), ATG5, UVRAG (UV radiation resistance-associated gene), GABARAP and LC3 has been described to be reduced or lost in several types of cancers [40-44]. On the contrary, during the later stages of tumorigenesis, some cancer cells present elevated autophagy levels allowing them to survive against metabolic stress. Indeed, the microenvironment of cancer cells presents reduced levels of nutrients, oxygen and growth factors leading to an altered metabolism and an impairment of ATP production [45, 46].

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

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

RESULTS

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

In order to determine the importance of the GABARAPL1 conjugation to autophagosomes on its tumor suppressive function, we designed MCF-7 breast cancer cell lines overexpressing either Flag:GABARAPL1:6His (GABARAPL1) or Flag:GABARAPL1-G116A:6His mutant (clone 1 and clone 2; GABARAPL1 G116A c1 and c2) (Figure 1A). First, we analyzed GABARAPL1 protein and mRNA expression levels in our cell models. As expected, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A expression were detected in MCF-7 GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells but not in control cells transfected with the empty vector (Figures 1B-1C). Interestingly, we noted that MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 cells showed a GABARAPL1 protein expression similar to the one observed in MCF-7 GABARAPL1 cells whereas MCF-7 GABARAPL1 G116A c2 cells presented a lower GABARAPL1 protein expression. We next wanted to check whether overexpression of GABARAPL1 modified the expression of its homologue GABARAP using an antibody which detects both proteins. Overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A in MCF-7 cells did not modify the expression of its homologue, GABARAP (Supplementary Figure S1A).

Our laboratory has previously reported that, during autophagy, GABARAPL1 needs to be cleaved, depending on its C-terminal glycine, before being associated to autophagic vesicles in HEK-293 cells [23]. We therefore wanted to know whether the G116A mutation impaired lipidation of GABARAPL1 and its localization to autophagosomes in MCF-7 cells. To do so, we studied GABARAPL1 expression in our different cell models following treatment with NH_4Cl , a lysosomal activity inhibitor, which led to the accumulation of autophagosomes and the lipidated form of GABARAPL1 called GABARAPL1-II [23]. Without treatment, only the mature soluble GABARAPL1-I form (19 kDa) was detected in MCF-7 GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells (Figure 1D). As expected, in MCF-7 GABARAPL1 cells, NH_4Cl treatment led to the appearance of the GABARAPL1-II form (16 kDa) but this treatment had no effect on MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. These results clearly demonstrate that the G116A mutation impaired the lipidation of GABARAPL1. In order to confirm that GABARAPL1 G116A cannot be cleaved, we transfected MCF-7 cells with three different vectors coding either GFP, GFP fused to the C-terminus of GABARAPL1 (GABARAPL1-GFP) or to the C-terminus

of GABARAPL1 G116A (GABARAPL1-G116A-GFP) (Figure 1E). When GABARAPL1-GFP is expressed the anti-GFP antibody recognized the truncated GFP protein due to the cleavage of GABARAPL1 at G116 (lane 2). The difference in size between the native GFP (lane 1) and the cleaved GFP (lane 2) was probably due to a supplementary linker sequence added in the EGFP-C1 commercial vector. These results were confirmed by probing with the anti-GABARAPL1 antibody which detected GABARAPL1 alone (lane 5). When GABARAPL1-G116A-GFP was expressed, we did not observe the truncated form of GFP (lane 3) or GABARAPL1 (lane 6). These results confirmed that the G116A mutation impaired the cleavage of the GABARAPL1 protein in the MCF7 cells. Since GABARAP is also cleaved during autophagy to give the membrane-associated form called GABARAP-II, we wanted to verify that overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A did not alter the lipidation of GABARAP. As expected, NH_4Cl led to an increase in the GABARAP-II form in MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells (Supplementary Figure S1B). However, this increase appeared similar in our different cell lines confirming that overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A did not modify expression or lipidation of the GABARAP protein.

Next, we studied the cellular localization of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A after treatment with BafilomycinA1 (BafA1), an inhibitor of autophagosome/lysosome fusion. Without treatment, MCF-7 GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A cells presented a diffuse GABARAPL1 staining in the cytoplasm (Figure 1F top panel). As expected, the treatment with BafA1 led to an accumulation of GABARAPL1 puncta around the nucleus in MCF-7 GABARAPL1 cells, indicating a relocation of GABARAPL1 to autophagosomes. On the contrary, treatment of MCF-7 GABARAPL1 G116A cells with BafA1 did not lead to any accumulation of GABARAPL1 puncta, confirming that GABARAPL1 G116A was unable to conjugate to autophagic vesicles (Figure 1F top panel). Similar results were obtained after treatment with EBSS, an inducer of autophagy, in the presence or absence of BafA1 (Figure 1F bottom panel). Indeed, treatment with EBSS increased the intensity of GABARAPL1 staining and GABARAPL1 puncta in MCF-7 GABARAPL1 but only increased the intensity of GABARAPL1 staining in GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells. As shown above, addition of BafA1 led to an accumulation of GABARAPL1 puncta in MCF-7 GABARAPL1 cells but not in MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells.

In order to study the effect of the G116A mutation on other functions of GABARAPL1 (those suggested to be independent of its conjugation to autophagosomes), we studied the impact of this mutation on the interaction of GABARAPL1 with TUBULIN and the degradation of GABARAPL1 by the proteasome [14, 16]. Firstly,

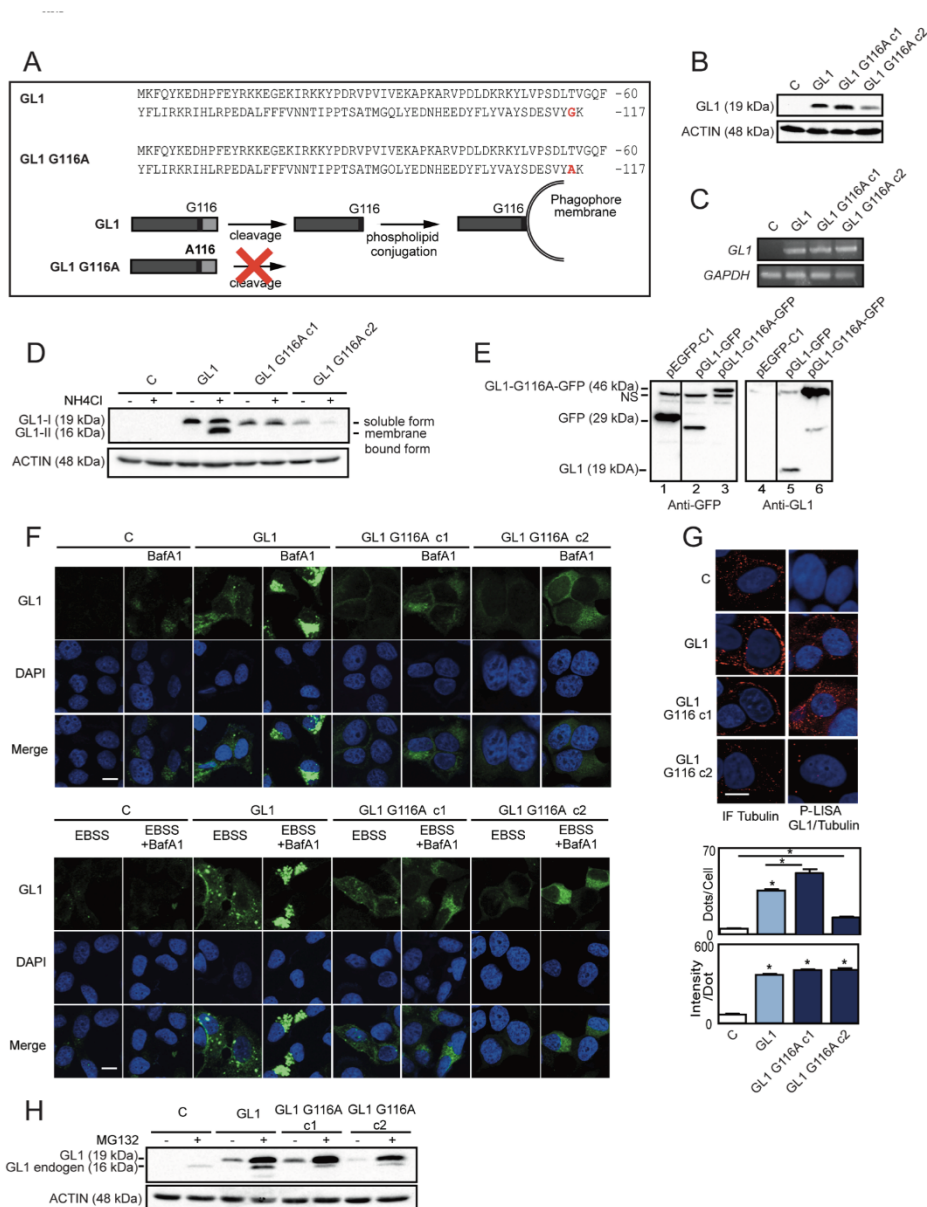


Figure 1: Characterization of MCF-7 overexpressing GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A. **A.** Alignment of the amino acid sequences of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A (Top). Schema representing the cleavage and lipidation of GABARAPL1 during autophagy (Bottom). **B.** Western blotting analysis of GABARAPL1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. Data are representative of three independent experiments. **C.** qRT-PCR analysis of GABARAPL1 mRNA expression. Representative data of two independent experiments performed in duplicate are shown. **D.** Western blotting analysis of GABARAPL1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in medium with or without 50 mM NH₄Cl for 2h. Data are representative of three independent experiments. **E.** Western blotting analysis of GFP and GABARAPL1 in MCF-7 cells transfected with the pGFP, pGABARAPL1-GFP and pGABARAPL1-G116A-GFP vectors. Data are representative of three independent experiments. **F.** Immunofluorescence analysis of GABARAPL1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in medium or EBSS with or without 100 nM BafA1 for 8 h. A representative image of two independent experiments performed in duplicate is shown. Scale bar represents 10 μm. **G.** P-LISA signals analysis of TUBULIN/GABARAPL1 interaction (red) and nuclei (blue) in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. A representative image of three independent experiments is shown. The number of red dots and the intensity per dots were counted using the Blobfinder software. 200 cells were randomly selected in 5 fields. Data are means ± S.E.M. *P < 0.05 compared to the control. Scale bar represents 5 μm. **(H)** Western blotting analysis of GABARAPL1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in medium with or without 2 μM MG132 for 16h. Data are representative of three independent experiments.

we studied the interaction between GABARAPL1 and TUBULIN using the P-LISA protocol (Proximity Ligation In Situ Assay), which allows the quantification of stable and transient interactions of endogenous proteins *in situ* [51]. Our experiments showed that GABARAPL1 G116A exhibited a similar level of interaction with TUBULIN compared to GABARAPL1 suggesting that the G116A mutation did not impair GABARAPL1/TUBULIN interaction (Figure 1G). Next, we studied endogenous or exogenous GABARAPL1 expression [Flag:GABARAPL1:6His and Flag:GABARAPL1-G116A:6His expression (19 kDa) or GABARAPL1 expression (16 kDa)] in our different cell models after treatment with MG132, a proteasome inhibitor (Figure 1H). As previously described, MG132 treatment led to an increase in both exogenous and endogenous GABARAPL1 expression levels in MCF-7 GABARAPL1 cells. Similar results were obtained in MCF-7 GABARAPL1 G116A cells, suggesting that the G116A mutation did not impair its degradation by the proteasome. On the contrary, MG132 treatment did not modify GABARAP expression levels in MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells (Supplementary Figure S1C). These results therefore suggest that the G116A mutation specifically alters GABARAPL1 conjugation to autophagosomes without affecting other functions of this protein.

The G116A mutation impaired the function of GABARAPL1 during induced but not basal autophagy

We then investigated, in a qualitative study, the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on autophagy by identifying autophagic vesicles using electron microscopy (Figure 2A). Overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A appears to lead to an increase in autophagic vesicles (Av) and lysosomes (Lys) compared to the control cells. Surprisingly, these results suggested that GABARAPL1 G116A, like GABARAPL1 might regulate autophagy induction.

Given these results, we next wanted to study the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A expression on autophagic flux. Indeed, our laboratory has previously shown that knocking down GABARAPL1 decreased autophagic flux in MDA-MB-436 cells [25]. During autophagy, LC3B is cleaved and linked to a phospholipid at the autophagosome to form the membrane-associated form LC3-II. The amount of this protein is directly correlated with the number of autophagosomes [20]. We therefore analyzed the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on LC3-II levels. Without treatment, overexpression of GABARAPL1 led to an increase in LC3-II levels compared to the control cell lines. On the contrary, overexpression of GABARAPL1

G116A did not regulate the levels of LC3-II (Figure 2B, lanes 1-4-7-10). Since the amount of LC3-II is not directly related to the autophagic flux but represents the number of autophagosomes at a particular time point, an increase in LC3-II might either indicate an increase in autophagic flux or a decrease in autophagolysosome degradation. In order to study autophagic flux, we compared the amount of LC3-II in the presence or absence of BafA1 (Figure 2B, lanes 2-5-8-11) or Chloroquine (CQ) (Figure 2B, lanes 3-6-9-12), two inhibitors of autophagosome/lysosome fusion. Treatments with BafA1 and CQ led to a greater increase in LC3-II protein levels in MCF-7 GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells compared to the control cells, suggesting an increased autophagic flux in these cells. These results suggested that GABARAPL1 might increase basal autophagic flux independently of its conjugation to autophagosomes. The effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A on induced autophagy, following treatment with EBSS, was then studied (Figure 2C). After treatment with EBSS, overexpression of GABARAPL1 led to an increase in LC3-II levels compared to the control cells whereas overexpression of GABARAPL1 G116A did not (Figure 2C, lanes 1-3-5-7). Combination of EBSS with BafA1 led to a greater increase in LC3-II levels in MCF-7 GABARAPL1 cells compared to the control cells (Figure 2C, lanes 2-4), suggesting increased autophagic flux. Interestingly, after treatment with EBSS and BafA1, MCF-7 GABARAPL1 G116A cells exhibited LC3-II levels similar to those observed in control cells (Figure 2C, lanes 2-6-8), suggesting that GABARAPL1 increased induced autophagic flux depending on its conjugation to autophagosomes.

In order to confirm these results, we used a double-tagged GFP-RFP-LC3 construct and studied the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on autophagosome and autophagolysosome numbers [52]. Since GFP fluorescence is sensitive to acidic and proteolytic conditions found in lysosomes but RFP fluorescence is not, this construct allows the discrimination of autophagosomes (RFP+/GFP+, yellow) and autophagolysosomes (RFP+/GFP-, red). Therefore, an increase in autophagic flux would result in a concomitant increase of red and yellow puncta. We used CQ as a negative control of this experiment. Indeed, the use of CQ led to an increase in yellow puncta but not red puncta specific of a blockade of autophagic flux (Supplementary Figure S2A). Without treatment, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A increased the number of autophagosomes as well as autophagolysosomes compared to the levels observed in control cells (Figure 2D left panel). These results suggested that GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A increased the basal autophagic flux. We next studied the number of autophagosomes and autophagolysosomes during induced autophagy. After treatment with EBSS, overexpression of GABARAPL1 led to a greater increase in autophagic flux, characterized by

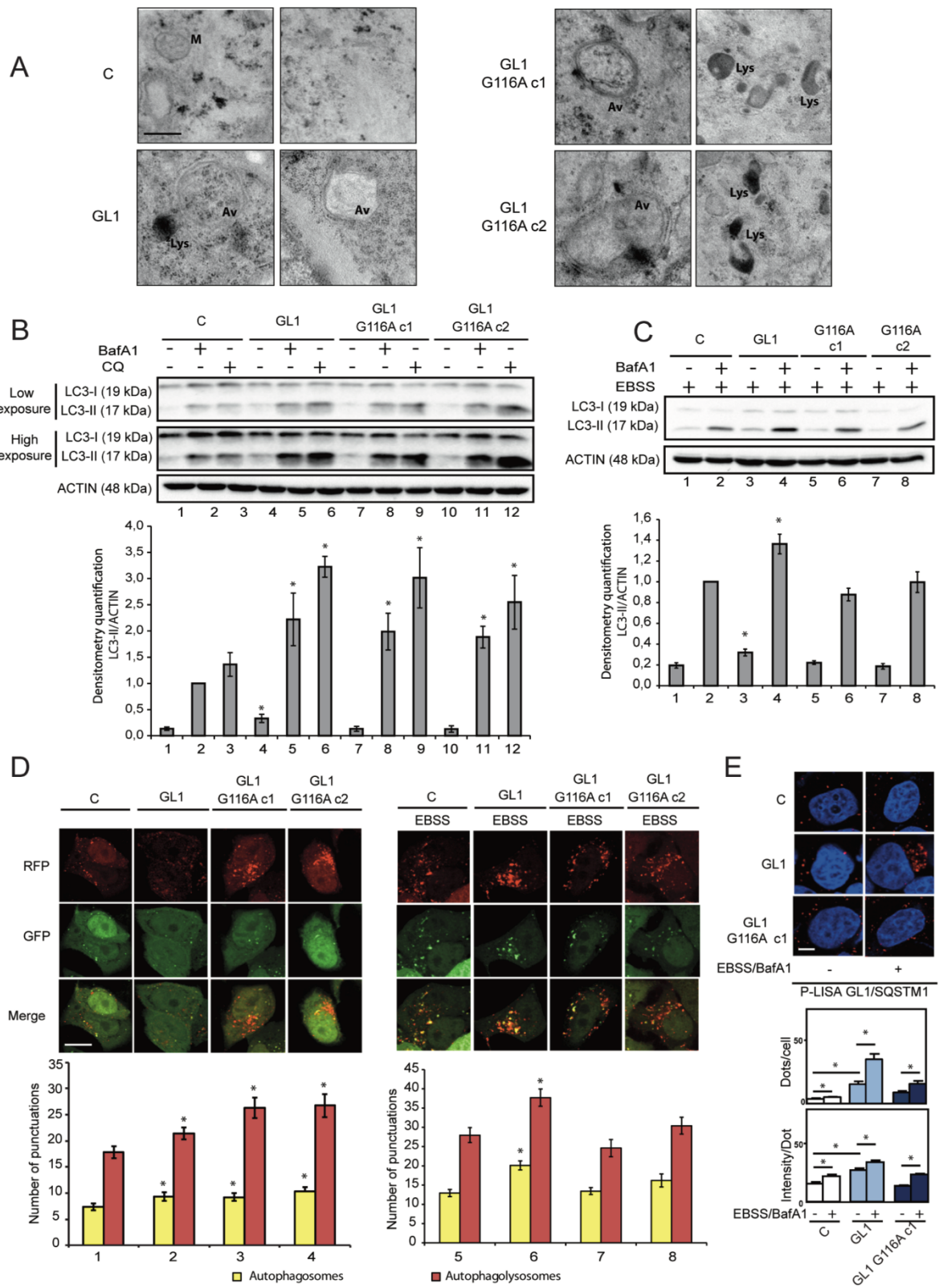


Figure 2: The G116A mutation impaired the effect of GABARAPL1 on induced but not basal autophagy. **A.** Electron microscopy of MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A cells. Av: Autophagic vesicles; Lys: Lysosomes and M: Mitochondria. Scale bar represents 0.25 μm . A representative image of 60 pictures for each cell lines is shown. **B.** Western blotting analysis of LC3 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in medium with or without 100 nM BafA1 or 40 μM Chloroquine (CQ) for 2h. A representative image of ten independent experiments is shown. LC3-II levels were quantified using the Image Lab software. Data are means \pm S.E.M. of ten independent experiments. *P <0.05 compared to the associated control. **C.** Western blotting analysis of LC3 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in EBSS for 4h with or without 100 nM BafA1 for 2h. A representative image of ten independent experiments is shown. LC3-II levels were quantified using the Image Lab. Data are means \pm S.E.M. of ten independent experiments. *P <0.05 compared to the associated control. **D.** GFP-RFP-LC3 puncta analysis in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells transfected with the ptf-LC3 vector and cultured in medium or EBSS. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 20 fields chosen at random. Red and yellow puncta were counted using the ImageJ software (Green and Red puncta colocalization tool). In each group, 20 cells were randomly selected. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 10 μm . **E.** P-LISA signals analysis of SQSTM1/GABARAPL1 interaction (red) and nuclei (blue) in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in complete medium or EBSS for 4h with 100 nM BafA1 for 2h. A representative image of three independent experiments is shown. The number of red dots and the intensity per dots were counted using the Blobfinder software. 200 cells were randomly selected in 5 fields. Data are means \pm S.E.M. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 5 μm .

an increase in autophagosomes and autophagolysosomes number (Figure 2D right panel). On the contrary, after treatment with EBSS, overexpression of GABARAPL1 G116A led to a similar number of autophagosomes and autophagolysosomes compared to the one observed in control cells suggesting that GABARAPL1 increased induced autophagic flux depending on its conjugation to autophagosomes. Altogether, results obtained by western blotting and GFP-RFP-LC3 transfection suggested that GABARAPL1 seemed to present different functions in basal or induced autophagy, which are dependent or independent of its conjugation to autophagosomes.

It has been previously shown that GABARAPL1, like the other members of ATG8 family, interacts with SQSTM1 during selective autophagy [29]. In fact, SQSTM1 recognizes ubiquitinated aggregates or organelles and then interacts with ATG8 proteins localized at the autophagosome membrane to direct their degradation. Moreover, it has been shown that the G120A mutation in LC3 or the G116A mutation in GABARAP or GABARAPL2/GATE-16 impaired their interaction with SQSTM1 [19, 21, 53]. Therefore we next wanted to confirm whether the G116A mutation also impaired the interaction of GABARAPL1 with SQSTM1. We therefore analyzed the interaction between SQSTM1 and GABARAPL1 in MCF-7 GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A cells using P-LISA (Figure 2E). First, we observed that the overexpression of GABARAPL1 increased its interaction with SQSTM1. As expected, treatment with EBSS and BafA1 led to an increased interaction of SQSTM1 with GABARAPL1. Without treatment, GABARAPL1 G116A did not interact with SQSTM1 since the signals observed were similar to the ones quantified for the interaction between endogenous GABARAPL1 and SQSTM1 in MCF-7 control cells. When MCF7 GABARAPL1 G116A cells were treated with EBSS and BafA1, we observed an increase in cellular dots but to a lower extent than the one quantified for GABARAPL1, suggesting that SQSTM1 interacts

preferentially with GABARAPL1 when it is localized in autophagosomes. We confirmed these results by studying the colocalization between SQSTM1 and GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A (Supplementary Figure S2B). Our results showed that, GABARAPL1 G116A can still interact with SQSTM1 but to a lesser extent than the interaction observed between GABARAPL1 and SQSTM1. Altogether, these results suggested that the G116A mutation, which prevented the conjugation of GABARAPL1 onto the autophagosomes, might impair its interaction with the cargo adaptor SQSTM1 and consequently its function in selective autophagy.

The G116A mutation impaired GABARAPL1 functions during late stages of autophagy

During the later stages of autophagy, a mature autophagosome fuses with a lysosome, a digestive organelle with an acidic lumen, to allow protein degradation and turnover. We previously reported that a knock-down of GABARAPL1 in MDA-MB-436 cells led to a decreased number of lysosomes compared to the control cells [25]. The effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression on lysosome acidification was then studied using LysoTracker, a fluorescent dye which specifically label acidic compartments including lysosomes. Confocal microscopy analysis showed that overexpression of GABARAPL1 led to an increase in LysoTracker fluorescence suggesting an increase in lysosomal acidification (Figure 3A). On the contrary, overexpression of GABARAPL1 G116A did not change the LysoTracker fluorescence levels compared to control cells. Treatment with EBSS led to an increase in LysoTracker fluorescence in control cells and cells overexpressing GABARAPL1 G116A. Interestingly, treatment with EBSS did not modify LysoTracker fluorescence in cells overexpressing GABARAPL1, probably because the levels in non-treated cells are already

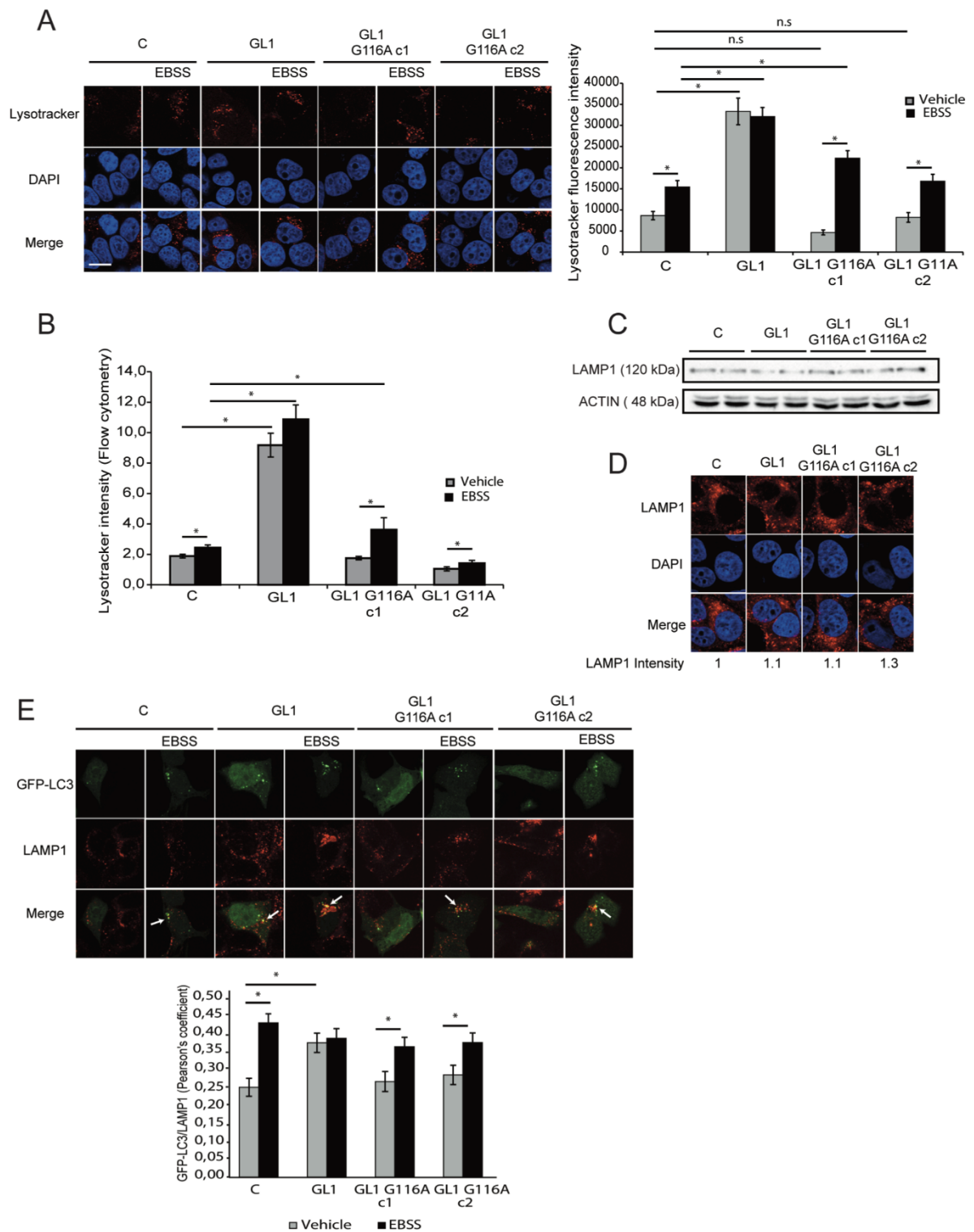


Figure 3: The G116A mutation impaired GABARAPL1 functions during late stages of autophagy. **A.** LysoTracker staining in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cultured in medium or EBSS for 4h observed with confocal microscope and quantified with the Blobfinder software. For each group, 100 cells were randomly selected. The data representative of three independent experiments are shown. Data are means \pm S.E.M. *P < 0.05 compared to the control. Scale bar represents 10 μ m. **B.** Intensity of LysoTracker fluorescence analyzed by flow cytometry using the flowing software. Data are means \pm S.E.M. of four independent experiments performed in duplicate. *P < 0.05 compared to the control. **C.** Western blotting analysis of LAMP1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. Data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown **D.** Immunofluorescence analysis of LAMP1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. A representative image of three independent experiments is shown. Scale bar represents 10 μ m. **E.** Colocalization of LC3 and LAMP1 in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells transfected with the pGFP-LC3 vector and immunostained for LAMP1. Colocalization of the autophagosome marker GFP-LC3 and the lysosomal marker LAMP1 was analyzed using a confocal microscope and the Pearson's coefficient using colocal_2 (ImageJ software). For each group, 25 cells were randomly selected. The data representative of two independent experiments are shown. Data are means \pm S.E.M. *P < 0.05 compared to the control.

elevated. Furthermore, we did not detect any change in the percentage of LysoTracker-positive vesicles following overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A (Supplementary Figure S3A). These results suggested that GABARAPL1 increased the acidification of lysosome depending on its conjugation to autophagosomes. These results were confirmed by the quantification of LysoTracker fluorescence using a flow cytometer (Figure 3B). Since an increase in lysosomal acidification could be linked to an increase in lysosomal number, we then studied the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on LAMP1 (Lysosome associated membrane protein 1) protein expression, a lysosomal marker. Our results showed that overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A did not significantly modify the levels of LAMP1 compared to those observed in control cells (Figure 3C). This result was confirmed by the observation of LAMP1 immunostaining using confocal microscopy. Indeed, overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A did not modify the fluorescence intensity of LAMP1 (Figure 3D).

The lysosome is a digestive organelle with an acidic lumen containing hydrolases such as cathepsins which are involved in the intracellular degradation and turnover of proteins. We next studied the activity of CATHEPSIN B during basal and induced autophagy using MagicRed (MR) (Supplementary Figure S3B). Without EBSS treatment, overexpression of GABARAPL1 led to an increase in MR fluorescence whereas overexpression of GABARAPL1 G116A did not. Moreover, during EBSS treatment, overexpression of GABARAPL1 led to a further increase in MR fluorescence compared to the one observed in the other cell lines (Supplementary Figure S3B). These preliminary results could suggest that the increase in lysosomal acidification observed in MCF-7 GABARAPL1 cells led to an increase in CATHEPSIN B activity. An increased lysosomal acidification and activity could be due to an increased autophagosome/lysosome fusion [54]. In order to verify this hypothesis, we then studied the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on GFP-LC3/LAMP1 colocalization, an event correlated with autophagosome/lysosome fusion (Figure 3E). Overexpression of GABARAPL1 led to an

increase in GFP-LC3/LAMP1 colocalization compared to control cells whereas overexpression of GABARAPL1 G116A did not. EBSS treatment led to an increase in GFP-LC3/LAMP1 colocalization in control cells and cells overexpressing GABARAPL1 G116A compared to non-treated cells. In cells overexpressing GABARAPL1, treatment with EBSS did not modify GFP-LC3/LAMP1 colocalization, probably because, as described for LysoTracker fluorescence, the levels in non-treated cells are already elevated. These results suggested that GABARAPL1 increased autophagosome/lysosome fusion depending on its conjugation to autophagosomes. In order to examine whether GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A localized at the autophagolysosome, we studied colocalization between GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A and LAMP1 (Supplementary Figure S2C). We observed that GABARAPL1 but not GABARAPL1 G116A colocalized with LAMP1 during autophagy, suggesting that the G116A mutation impaired the localization of GABARAPL1 to lysosomes, which is consistent with the fact that this protein could not be linked to autophagosomes anymore. These results suggested that GABARAPL1 might increase autophagosome/lysosome fusion depending on its conjugation to autophagosomes, which could then also explain the increased lysosomal acidification observed in MCF-7 GABARAPL1 cells.

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

Since it has been previously shown that GABARAPL1 interacts with ULK1 [26, 27], a protein involved in initial events of autophagosome formation, we then studied the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression during the induction of autophagy and particularly MTOR, a well-known ULK1 inhibitor and autophagy inhibitor [26, 27]. Without treatment overexpression of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A did not significantly modify MTOR phosphorylation (Figure 4A, lanes 1-3-5-7). Moreover, treatment with EBSS led to the same decrease in MTOR phosphorylation

in MCF-7 GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 or c2 cells (Figure 4A, lanes 2-4-6-8). We therefore studied the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression on the phosphorylation of P70S6K (p70S6 kinase), a cellular MTOR target (Figure 4B).

Without treatment, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A led to a decreased phosphorylation of P70S6K compared to control cells suggesting that GABARAPL1 inhibited MTOR activity and consequently P70S6K phosphorylation independently

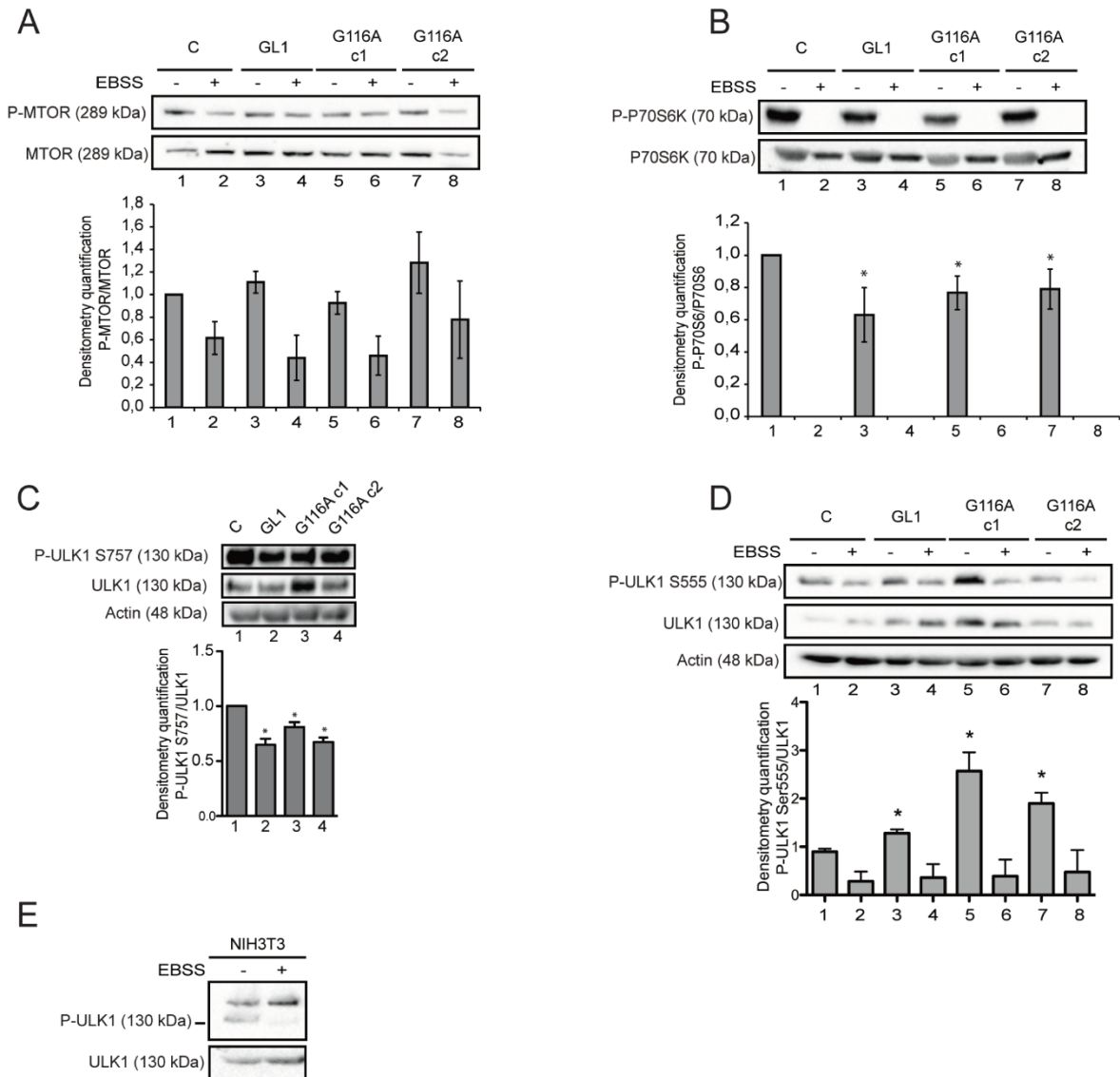


Figure 4: The G116A mutation did not impair GABARAPL1 functions during early stages of autophagy. Western blotting analysis of MTOR phosphorylation **A**, P70S6 phosphorylation **B**, and ULK1 phosphorylation at Ser555 **D**, in MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells cultured in medium or EBSS for 4h. Protein levels were quantified using the Image Lab. Representative image of four independent experiments is shown. Data are means \pm S.E.M. of four independent experiments. * $P < 0.05$ compared to the control. **C**, Western blotting analysis of ULK1 phosphorylation at Ser757 in MCF-7 C, GABARAPL1, and GABARAPL1 G116A cells. Protein levels were quantified using the Image Lab. Representative image of three independent experiments is shown. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared to the control. **E**, Western blotting analysis of ULK1 phosphorylation at Ser555 in NIH3T3 cells cultured in medium or EBSS for 4h. Protein levels were quantified using the Image Lab. Representative image of two independent experiments is shown.

of its conjugation to autophagosomes. Treatment with EBSS led to total loss of P70S6K phosphorylation in our cell lines (Figure 4B). Since ATG8 family members and more particularly GABARAP family proteins have been described to interact with ULK1 and allow its conjugation to autophagosomes [26], we wanted to analyze the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A overexpression on the phosphorylation of ULK1 at Ser757, which is a direct target of MTOR and is associated with an inhibition of autophagy [7]. Overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A c1 led to a decreased phosphorylation of ULK1 at Ser757 (Figure 4C), confirming that GABARAPL1 indeed inhibited MTOR activity and ULK1 phosphorylation at Ser757 independently of its conjugation to the autophagosomes. We then examined another phosphorylation site of ULK1 at Ser555, a phosphorylation event which has been described to be necessary for autophagy induction [8]. Without treatment, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A led to an increased phosphorylation of ULK1 at Ser555 (Figure 4D, lanes 1-3-5-7). It is interesting to note that overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A also increased total levels of the ULK1 protein. It has been previously shown in NIH3T3 cell lines that starvation induced by Krebs-Henseleit medium deprived of amino acids led to an increase in phosphorylation of ULK1 at Ser 555 [55]. On the contrary, in an MCF7 cells, treatment with EBSS led to a complete decrease in ULK1 phosphorylation. So, we repeated our experiment in NIH3T3 cells (Figure 4E) and demonstrated that treatment with EBSS also led to a decrease in Ser555 phosphorylation of ULK1 in NIH3T3 cell line. The use of different starvation medium may therefore explain these contradictory results.

Altogether, these results suggested that GABARAPL1 could regulate early induction autophagy steps independently of its conjugation to autophagosomes.

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

Since *GABARAPL1* has been previously described as a tumor suppressor gene [47, 48], we wondered whether the role of GABARAPL1 in cancer was dependent of its conjugation to autophagosomes. To answer this question, we examined the effect of GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A overexpression on cancer cell phenotypes. As previously shown, overexpression of GABARAPL1 led to a decrease in cell proliferation [47]. However, overexpression of GABARAPL1 G116A led to cell proliferation rates similar to those obtained in control cells (Figure 5A). This conclusion was the same regarding other *in vitro* cancer cell phenotypes such as clonogenicity, cell adhesion, anchorage independent-cell proliferation and

invasion (Figures 5B-5E). However, different results were obtained regarding cell migration. Indeed, overexpression of GABARAPL1 decreased cell migration in a transwell assay, but surprisingly, overexpression of GABARAPL1 G116A also led to a decrease in cell migration (Figure 5F). In order to confirm these results, we studied cell migration using a wound healing assay. This experiment led to similar results suggesting that overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A decreased migration rates (Figure 5G). We next wanted to confirm the effects of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A on cell cancer phenotype in a second breast cancer cell lines. To do so, the luminal BT474 breast cancer cell lines was first subjected to transient transfection with the Ctrl, the Flag:GABARAPL1:6His (GABARAPL1) or the Flag:GABARAPL1-G116A:6His (G116A)-expressing vectors (Supplementary Figure S4A) and then analyzed using proliferation and migration assays (Supplementary Figure S4B and C). As already observed for cell migration in the MCF-7 cells, overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A in BT474 cells led to a decrease in cell proliferation and migration. These results suggested that GABARAPL1 conjugation to autophagosomes may not be necessary for its role in cancer cell regulation *in vitro*.

In order to conclude about the effect of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A in cancer, we studied *in vivo* the tumor growth after injection of MCF-7 C, GABARAPL1 or GABARAPL1 G116A cells into Rag γ/c mice. The tumor size was monitored for two months following injection. According to previously published data [50], overexpression of GABARAPL1 decreased the size and inhibited the growth of the tumors *in vivo* (Figure 6A). Overexpression of GABARAPL1 G116A also led to a significant decrease in tumor growth. In order to confirm the overexpression of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A in the respective tumor, we next wanted to analyze levels of these proteins in tumors by IHC (Figure 6B). MCF-7 GABARAPL1 G116A c1 cells showed a GABARAPL1 staining similar to those observed in MCF-7 GABARAPL1 cells whereas MCF-7 GABARAPL1 G116A c2 cells presented a lower GABARAPL1 staining. These results were consistent with those described *in vitro* by western blotting (Figure 1B). Interestingly, we noted that GABARAPL1 expression levels seemed to be inversely correlated with tumor growth, but we cannot exclude that there are other intrinsic differences which may influence tumor growth unrelated to GABARAPL1 expression. Moreover, only MCF-7 GABARAPL1 cells showed a GABARAPL1 vesicular staining in tissue sections from tumors. These results suggested that GABARAPL1 could inhibit tumor growth independently of its conjugation to autophagosomes.

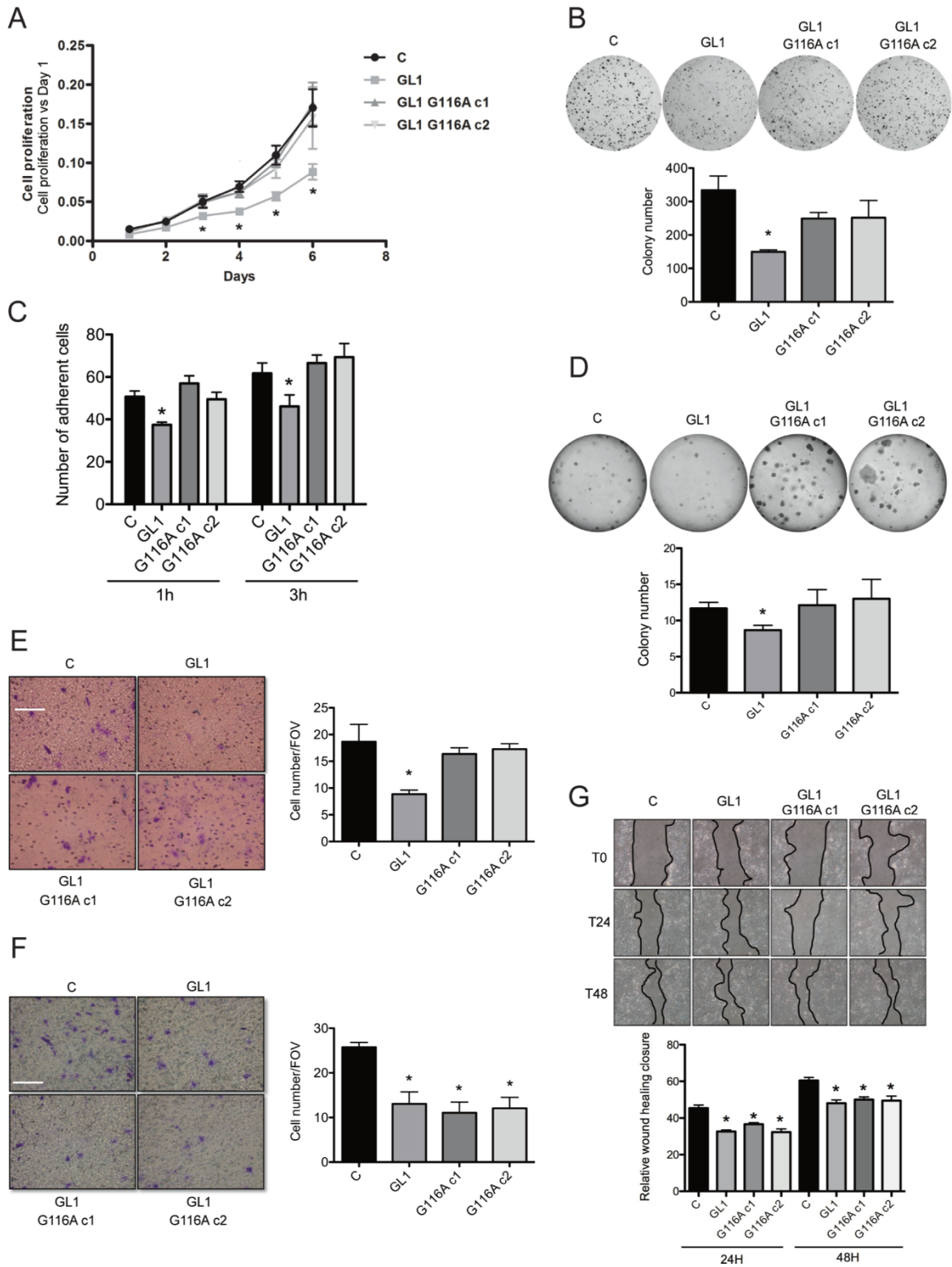


Figure 5: The G116A mutation modified the effect of GABARAPL1 on some cancer cell phenotypes *in vitro*. **A.** Growth rate of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells using MTT assay. The data representative of three independent experiments performed in 24 replicates are shown. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. **B.** Clonogenic assay of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. The colony numbers were evaluated by counting using Vision Capt software. The data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. **C.** Adhesion of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. The data representative of three independent experiments performed in triplicate are shown. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. **D.** Colonies formation in soft agar of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells. Representative cell colonies in soft agar are shown. Data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. **E.** Invasion of MCF-7 C, GABARAPL1, GABARAPL1 G116A c1 and c2 cells in Boyden-modified chamber. A representative image of ten fields of view (FOV) of each membrane is shown. 10 FOV were randomly selected and the number of invasive cells was determined. Data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 10 μ m. **F.** Migration of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells in Boyden-modified chamber. A representative image of ten fields of view (FOV) of each membrane is shown. 10 FOV were randomly selected and the number of migrative cells was determined. Data representative of three independent experiments performed in duplicate are shown. Data are means \pm S.E.M of three independent experiments. *P <0.05 compared to the control. Scale bar represents 10 μ m. **G.** Migration of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells using wound healing assay. Data representative of two independent experiments performed in 8 replicates are shown. The wound area was quantified using imageJ software. Data are means \pm S.D of two independent experiments. *P <0.05 compared to the control.

DISCUSSION

GABARAPL1 belongs to the ATG8 family whose function in autophagy has been far less studied than the one linked to the members of the LC3 family. During autophagy, GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles and acts with other GABARAP family members

to regulate autophagosome maturation [23, 24] and autophagosome-lysosome fusion [56]. Moreover, several studies have highlighted a role of GABARAPL1 as a tumor suppressor protein [25, 47, 50]. This tumor suppressive function has been suggested to be dependent on selective autophagy degradation and its interaction with SQSTM1 [50].

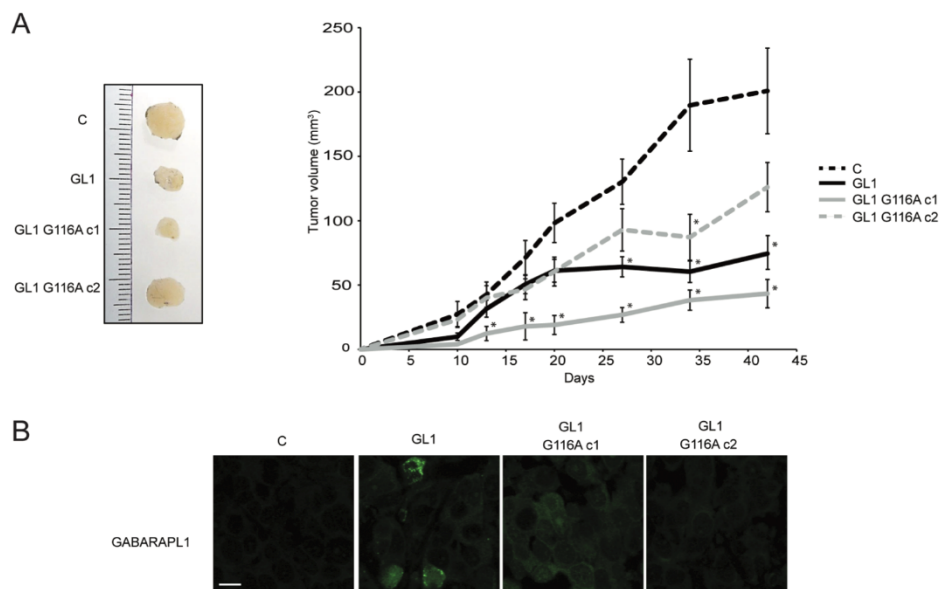


Figure 6: The G116A mutation did not modify the effect of GABARAPL1 on tumor growth *in vivo*. Growth of MCF-7 C, GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A cells injected subcutaneously in Rag γ /c mice (n = 12 per group). One week prior to cell inoculation and until the end of the experiment, estrogen was administered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

In this study, we demonstrated that GABARAPL1 plays a major role during late stages of autophagy, but can regulate earlier steps of autophagy, as well. More importantly, we showed that these two functions do not necessarily require the conjugation of GABARAPL1 to autophagosomes and significantly, we demonstrated that the tumor suppressive function of GABARAPL1 seems to be independent of its conjugation to autophagosomes (see model in Figure 7).

To investigate the role of GABARAPL1 conjugation to autophagosomes on its tumor suppressive function, we designed two *in vitro* models: one MCF-7 cell line stably overexpressing GABARAPL1 and two stably overexpressing the GABARAPL1 G116A mutant protein which is no longer able to be linked onto phospholipids [23]. In our models, the G116A mutation indeed impaired the cleavage, and subsequently the lipidation and conjugation of GABARAPL1 to autophagosomes (Figures

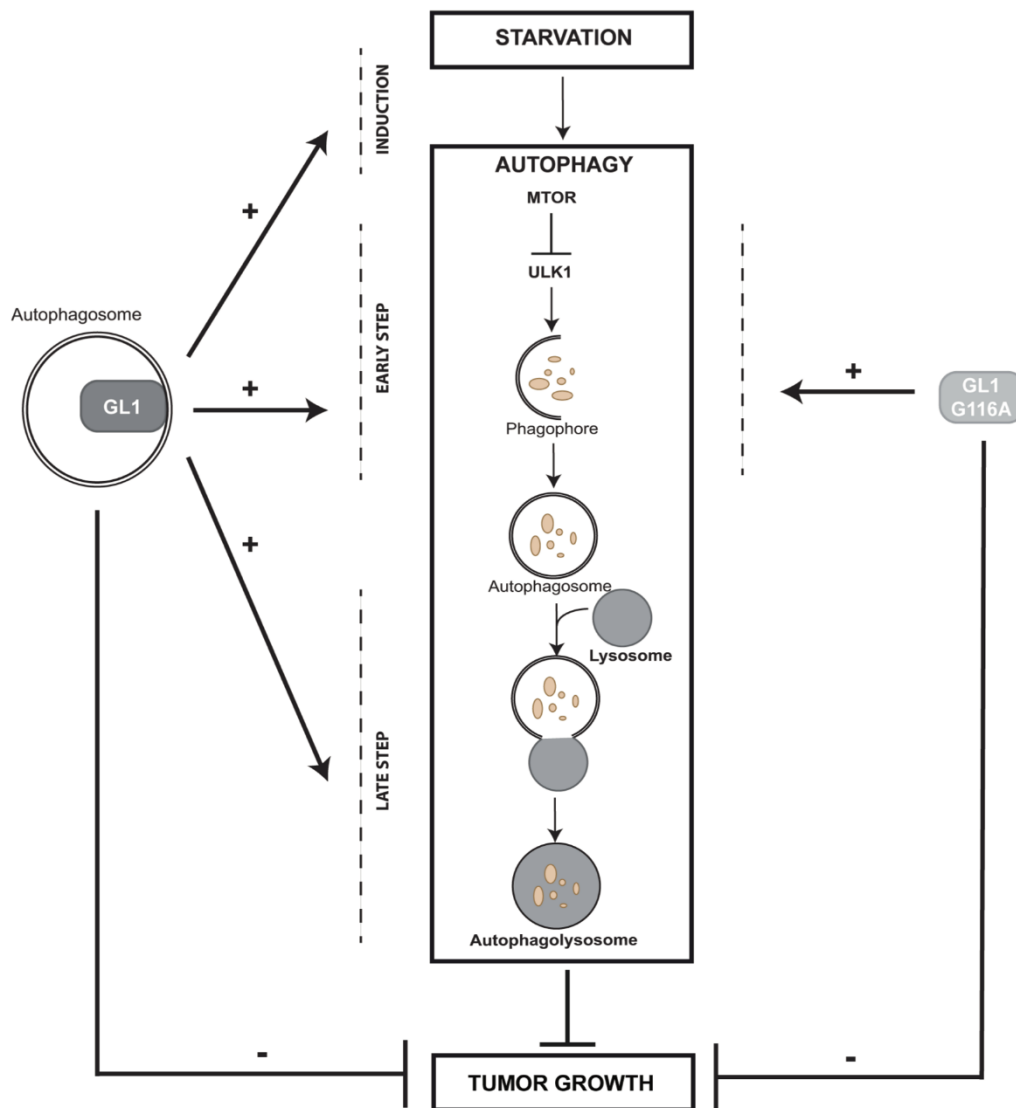


Figure 7: GABARAPL1 functions in autophagy and cancer. Our results demonstrated that GABARAPL1, which is linked to the autophagosome, enhances basal and induced autophagy. GABARAPL1 also increases early stages of autophagy through regulation of MTOR or ULK1 activity and late stages of this process through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

1D-1E). Our data are consistent with previous studies describing similar results for the G120A mutation in LC3 or the G116A mutation in GABARAP or GABARAPL2/GATE-16 [19, 21, 53]. Nevertheless, these previous studies have only investigated the requirement for the C-terminal processing of GABARAP family members on their function in intracellular transport.

GABARAPL1, like the other members of the ATG8 family, can interact with SQSTM1 to enhance the degradation of ubiquitinated aggregates through selective autophagy [29]. In our models, the G116A mutation impaired the interaction of GABARAPL1 with SQSTM1 (Figure 2E), suggesting that this protein only interacts with GABARAPL1 when it is localized at the surface of the autophagosomes and that the processing of GABARAPL1 is required for its function during selective autophagy with SQSTM1. These results are consistent with data demonstrating that an ATG4B mutant or the mutant LC3 G120A, which both impaired the maturation and lipidation of LC3, inhibited the interaction of LC3 with SQSTM1; suggesting that SQSTM1 preferentially interacted with LC3-II, the lipidated form of LC3, to be efficiently recruited to the autophagosomes and transported into autophagolysosomes [57, 58]. Interestingly, it has been also demonstrated that the mutation of the LC3-binding site in SQSTM1 inhibited the SQSTM1-LC3 interaction and inhibited the degradation of specific substrates through selective autophagy without affecting overall autophagy [59]. Our data are consistent with these results and confirm that the processing of GABARAPL1, like those of other ATG8 family members, could be important for its conjugation to autophagosomes, its interaction with SQSTM1 and its function in selective autophagy.

Previously, we have demonstrated that a knock-down of GABARAPL1 led to a decrease in basal autophagic flux which was suggested to be linked to a decrease in lysosome number [25]. As expected, overexpression of GABARAPL1 in MCF-7 led to an increase in basal autophagic flux. Surprisingly, overexpression of the GABARAPL1 G116A mutant led to a similar result suggesting that the function of GABARAPL1 in basal autophagy might be independent of its conjugation to autophagosomes (Figures 2B and 2D). We have shown that GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A both reduced MTOR activation, inhibited ULK1 phosphorylation (Ser757) mediated by MTOR and increased ULK1 phosphorylation (Ser555) mediated by AMPK during the early steps of autophagy (Figure 4). It has been described that ULK1 inhibits MTOR through the phosphorylation of RAPTOR inducing a positive regulatory loop of autophagy induction [60]. We therefore suggested that GABARAPL1, through its interaction with ULK1 [26, 27], could activate this protein leading to the subsequent inhibition of MTOR. In a recent study, Tooze and colleagues have shown that, in HEK293 cells,

GABARAP knock-down decreases ULK1 activation demonstrated by the reduction of the phosphorylation in one of its target, ATG13. They also showed that GABARAPL1 interacts with ULK1 *via* its LIR motif but independently of its lipidation [61]. Moreover, it has also been shown in our laboratory, that GABARAPL1 can interact with the energy sensor AMPK (unpublished data), which has been previously shown to inhibit MTOR and activate ULK1 by phosphorylation (Ser555) [5, 8, 62]. Our results are therefore in agreement with previous studies suggesting a link between basal autophagy and MTOR activity [63]. One hypothesis would be that, in fed condition, GABARAPL1 could recruit AMPK in close proximity of the ULK1 complex leading to the increased ULK1 activation, decreased MTOR activity and the induction of basal autophagy.

During induced autophagy following EBSS treatment, overexpression of GABARAPL1, but not GABARAPL1 G116A, led to an increase in autophagic flux suggesting that the role of GABARAPL1 during induced autophagy requires its conjugation to autophagosomes (Figures 2C-2D). This function could be associated with its role in late stages of autophagy. Indeed, overexpression of GABARAPL1, but not GABARAPL1 G116A, led to an increased lysosomal activity and autophagosome/lysosome fusion (Figure 3). These results are in agreement with the recent literature which identified GABARAP family members as primary contributors to starvation-induced autophagy by the regulation of autophagosome-lysosome fusion [56]. Recently, it has been demonstrated that ATG8 family members, localized on the surface of the autophagosomes, could favor autophagosome/lysosome fusion through their interaction with the protein PLEKHM1 (pleckstrin homology domain containing, family M [with RUN domain] member 1) at the lysosomal surface [64, 65]. It has been also demonstrated that the members of the GABARAP family can recruit PI4KII α (Phosphatidylinositol 4-kinase II α) to the autophagosomes leading to the generation of PI4P (Phosphatidylinositol 4-phosphate) which favor autophagosome/lysosome fusion [66]. These observations could explain the increase in lysosome activity and autophagosome/lysosome fusion observed in the presence of the membrane-bound GABARAPL1 but not the cytosolic GABARAPL1 G116A. Moreover, GABARAPL1 is known to interact with microtubules and favor their polymerization [14], and microtubules have been shown to regulate autophagosome/lysosome fusion by relocalizing these organelles to the juxta-nuclear region during autophagy [67, 68]. We could then hypothesize that GABARAPL1, but not GABARAPL1 G116A, could improve microtubule polymerization and therefore facilitate the transport of autophagosomes and lysosomes to the juxta-nuclear region to lead to increased autophagosome/lysosome fusion. Moreover, during autophagy, lysosome activation has been described

to require two mechanisms: MTOR inhibition and autophagosome/lysosome fusion [54]. In fact, MTOR not only inhibits ULK1 during early stages of autophagy but also reduces late stages of autophagy through the inhibition of lysosomal function. These data could explain the increased lysosome activity observed in GABARAPL1 overexpressing cells which might present both MTOR inhibition and increased autophagosome/lysosome fusion whereas GABARAPL1 G116A overexpressing cells would only display MTOR inhibition.

Altogether, our results therefore suggest that GABARAPL1 could act during early and late steps of autophagy, functions which are either dependent or independent of its conjugation to autophagosomes. Since GABARAPL1 has also been described as a tumor suppressor protein in breast cancer, we then wondered whether the tumor suppressive function of GABARAPL1 require its conjugation to autophagosomes. *In vitro*, overexpression of GABARAPL1 led to an inhibition of cancer cell phenotypes (proliferation, clonogenicity, adhesion and invasion) which confirmed previous data obtained in the laboratory (Figures 5A-5E) [25, 47]. Interestingly, the G116A mutation inhibited GABARAPL1 tumor suppressive function on several phenotypes apart from migration in MCF7 cells *in vitro* (Figures 5F-5G). Furthermore, the G116A mutation did not alter the effect of GABARAPL1 on cell proliferation and migration phenotypes in another breast cancer cell line BT474 *in vitro* (Figures S4). These data therefore suggest that GABARAPL1 conjugation to autophagosomes may not be necessary for its function in cancer cells *in vitro*.

In order to characterize the effect of GABARAPL1 conjugation to autophagosomes on cancer progression *in vivo*, we studied tumor growth following injection of GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A-overexpressing cells into Rag γ/c mice (Figure 6A). Overexpression of GABARAPL1 led to a decrease in tumor size confirming previous results obtained in *nude* mice [50]. Overexpression of GABARAPL1 G116A also led to a decrease in tumor growth suggesting that GABARAPL1 conjugation to autophagosomes could not be necessary for its tumor suppressive function *in vitro* as well as *in vivo*. Moreover, given that GABARAPL1 G116A, which predominately cannot conjugate to autophagosomes and interacts less with SQSTM1, still presented a tumor suppressor role, we might think that GABARAPL1 function in selective autophagy is not essential for its tumor suppressive function. GABARAPL1 and GABARAPL1 G116A could present a tumor suppressor role through the inhibition of MTOR which has been previously shown to be involved in cell proliferation and tumor progression [69-71]. But, we cannot exclude that GABARAPL1 might present a tumor suppressor role through functions independent of its role in autophagy. For example, BECN1, which is a protein involved in the initiation of autophagy and previously described as a tumor

suppressor gene frequently deleted or downregulated in cancer [42, 72, 73], can inhibit tumorigenesis through the inhibition of MCL-1 stabilization or WNT1 (wingless-type MMTV integration site family, member 1) activation, two mechanisms independent of autophagy [74, 75].

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

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Earle's balanced salt solution (EBSS, E3024), bafilomycin A1 (B1793), chloroquine (C6628), MG132 (C2211) and NH_4Cl (A0171) were purchased from Sigma-Aldrich. For the western blotting experiments, the following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Proteintech, 11010-1-AP, 1:1000), monoclonal anti-GABARAPL1/GABARAP (Millipore, AB15278, 1:1000), polyclonal anti-LC3 (Sigma-Aldrich, L8918, 1:3000), monoclonal anti-LAMP1 (Abcam, Ab25630, 1:1000), monoclonal anti-MTOR (Cell signaling, #2983, 1:1000), polyclonal anti-phospho-MTOR (Cell signaling, #2974, 1:1000), polyclonal anti-P70S6K (Cell signaling, #9202, 1:1000), polyclonal anti-phospho-P70S6K (Cell signaling, #9205, 1:1000), monoclonal anti-phospho-ULK1 (Ser555) (Cell signaling, #5869, 1:1000), monoclonal anti-phospho-ULK1 (Ser757) (Cell signaling, #14202, 1:1000), monoclonal anti-ULK1 (Cell signaling, #8054, 1:1000), polyclonal anti-GFP (Chemicon Millipore, AB3080, 1:1000), polyclonal anti-ACTIN (Sigma-Aldrich, A5060, 1:15000), polyclonal anti-rabbit (P.A.R.I.S, B12407, 1:10000) and polyclonal anti-mouse (P.A.R.I.S, B124130, 1:10000). For the immunofluorescence and P-LISA experiments, the following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Proteintech, 11010-1-AP, 1:200), monoclonal anti-LAMP1 (Abcam, Ab25630, 1:100), monoclonal anti-SQSTM1 (Santa Cruz, sc-28359, 1:250), Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (Life technologies, A-21422, 1:800), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Life technologies, A-11008, 1:800) and polyclonal anti-rabbit FITC (P.A.R.I.S, B12107, 1:200).

Cell culture and treatment

MCF-7 control cells (C) and MCF-7 Flag:GABARAPL1:6His (GABARAPL1) cells were obtained previously in our laboratory following

transfection with pcDNA3.1 control, pcDNA3.1-Flag-GABARAPL1-(His)6 [47]. MCF-7-Flag:GABARAPL1-G116A:6his (GABARAPL1 G116A c1 and c2) cells were obtained in the same way following transfection with pcDNA3.1-Flag-GABARAPL1-G116A-(His)6 vectors. The cells were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (PAA, E15-891) supplemented with 100 µg/ml penicillin/streptomycin (PAA, P11-010) and 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA, A15-101) in a 5 % CO₂ incubator at 37°C. To inhibit autophagosome/lysosome fusion, cells were incubated for 2 h in complete medium supplemented with 100 nM bafilomycin A1, 40 µM chloroquine or 50 mM NH₄Cl. To induce autophagy, cells were incubated in EBSS for 4h at 37°C. To inhibit proteasome degradation, cells were cultured in complete medium supplemented with 2 µM MG132 for 16 h.

For transient transfection, 2 µg of pGFP, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP, 200 µl Jetprime Buffer and 4 µl Jetprime reagent (Polyplus transfection, 114-07) were used per reaction according to the manufacturer's protocol.

Western blotting

Cells were scraped, harvested and lysed in SB1X. Protein lysates were sonicated for 5 s before loading (Sonic and Materials), separated on a 10 or 12.5 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before being transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, 162-0177). The membrane was blocked with 5 % nonfat milk in Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) and incubated with primary antibodies at the previously indicated dilutions. Immunoreactive bands were detected using secondary goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled anti-mouse or anti-rabbit antibodies and the *p*-coumaric acid-enhanced chemiluminescent (PCA-ECL) solution [76] and were analyzed using the ChemiDoc XRS+ system (Biorad). Protein levels were quantified using the Image Lab software.

RT-PCR

Total RNAs were extracted as previously described [77]. For RT-PCR analysis, 2 µg of total RNAs were reverse transcribed using the RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase to obtain cDNA (Sigma, M1302). The exogenous *GABARAPL1* primer sequences (Flag:GABARAPL1:6His) were: T7 sens 5'-TAAATACGACTCACTATAGGG-3' and BamHI reverse 5'-CGCGGATCCGCCTTCCCATAGACTCTC-3' and the following primer sequences were used for *GAPDH*: GAPDH S 5'-GCGAGATCCCTCCAAAATCA-3' and

GAPDH R 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. The DreamTaq DNA polymerase (Life technologies, EP0711) was used to amplify *GABARAPL1* and *GAPDH* from the template cDNA. *GAPDH* was used as an internal control. Polymerase chain reaction was performed for 35 cycles: initial denaturation at 94°C for 5 min, denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 52°C for 30 seconds, extension at 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 10 min. All PCR products were analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel and signals were visualized using a Gel doc EZ imager (Biorad).

Immunofluorescence and confocal microscopy

MCF-7 cells were plated on coverslips in 24-well plates at a density of 10⁵ cells/well. For transient transfection, the GFP-LC3 (green fluorescent protein-microtubule-associated protein light chain 3) plasmid was kindly provided by Dr. Elazar (Weizmann Institute, Israël) and the ptf-LC3 vector was purchased from Addgene (137624). Plasmids were transfected using the Jetprime reagent (Polyplus transfection, 114-07) according to the manufacturer's protocol. After the designated treatments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4 % PFA (paraformaldehyde) in PBS for 15 min at room temperature and mounted in Vectashield Hardset (Vector laboratories, H1400). The cells were then examined and photographed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000). For ptf-LC3, green, red and yellow puncta were counted using the "Green and Red puncta colocalization tool" designed for ImageJ. For each experiment, 20 cells were randomly selected.

For LysoTracker staining, cells duplicate were stained with 500 nM of LysoTracker® Red DND-99 (Life technologies, L-7528) for 1 h. Cells were then washed with PBS, fixed with 4 % PFA in PBS for 15 min at room temperature and mounted with Vectashield Hardset. The cells were then examined and photographed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000). For each group, 100 cells were randomly selected.

For *GABARAPL1*, *LAMP1* and *SQSTM1* immunostaining, cells were washed with PBS and fixed with 4 % PFA in PBS for 15 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.2 % Triton-X100 in PBS for 5 min, washed with PBS, blocked with 5 % BSA (bovine serum albumin) in PBS for 45 min, incubated with primary antibodies overnight at 4°C, at the previously indicated dilutions, and finally with a secondary goat anti-rabbit-FITC or an Alexa Fluor 555 goat anti-mouse for 1 h. The cells were then mounted with Vectashield Hardset and analyzed using a confocal microscope. Each picture is representative of a typical cell staining observed in 10 fields chosen at random. Colocalization of the autophagosome marker GFP-LC3 and the lysosomal marker *LAMP1* was analyzed using a confocal microscope and the Pearson's coefficient using

coloc_2 (ImageJ software). For each group, 25 cells were randomly selected.

For immunofluorescence staining of tumor tissue, tumors were embedded in Tissue-Tek (Microm microtek, F/62550-1) and sliced using a Cryostat (Microm microtech, HM560) (Plateau technique d'histopathologie, DIMaCell platform). The slides were incubated at 95°C for 40 min in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, pH 6), overnight with the previously described GABARAPL1 antibody and 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibody at previously indicated dilutions. After each incubation, the slides were rinsed thrice in 1% PBS-Triton X-100. After being mounted in PBS-glycerol mounting medium, the slides were observed and analyzed using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000). Two independent experiments were performed.

Cell migration and invasion assays

10^5 cells were diluted in 250 μ l serum-free medium, added to the upper chamber of the Boyden modified chamber™ (SPL Life Sciences) and incubated for 24 h at 37°C. For the cell invasion assay, 50 μ l of extra cellular matrix (ECM) gel (Sigma-Aldrich, E1270, 1 mg/ml) were added to the upper chamber 5 h before cell seeding. The invasive cells were fixed, stained with 2 % crystal violet and images of each membrane were acquired. Finally, the invasive cells located in the lower chamber were counted manually. 10 FOV were randomly selected and the number of invasive and migrative cells was determined. Three independent experiments were performed in duplicate.

Cell proliferation

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

Colony formation assay

Cells were plated duplicate in 6-well plates at a density of 2×10^3 cells/well. After 15 days, colonies were fixed with 100% ethanol for 10 min and stained with 2%

crystal violet for 10 min. The dye in excess was rinsed with water and the colony number was imaged using a ChemiDoc XRS+ and Image Lab 2.0 software (Biorad). Quantitative changes in clonogenicity were determined by counting the colonies, using Bio-Rad Vision-Capt software. Three independent experiments were performed in duplicate.

Cell-matrix adhesion assay

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

Anchorage independent cell proliferation

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

Wound healing assay

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well. Following confluency, two artificial wound per well were performed into the monolayers using a micropipette tip. After wounding, the tissue culture medium was removed, and cells were washed at least twice in PBS to eliminate detached cells. Wound closure was monitored after 24 h, 48 h and 72 h using image J software. The migration of cells was expressed as the percentage of wound closure: % of wound closure = $[(A_{t=0} - A_{t=\Delta h})/A_{t=0}] \times 100\%$. $A_{t=0}$ is the wound area measured immediately after scratching, and $A_{t=\Delta h}$ is the wound area measured at 24 h, 48 h and 72 h after scratching. Two independent experiments were performed in 8 replicates.

Xenograft experiments

Rag γ/c mice were obtained from Taconic (Germantown, NY, USA) and maintained in the UMR1098 animal facility (agreement number #C25-056-7). Approval for animal experimentation and care was received from the "Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection

Animale” delivered by the “Ministère de l’Agriculture”, Paris, France and experimental procedures were approved by a local ethic committee. One week prior to cell inoculation and until the end of the experiment, estrogens were administrated at 1 µg/ml in drinking water. A total of 1.5×10^6 cells of the different cell lines resuspended in 100 µL of PBS were inoculated subcutaneously in RAGg/c mice (n = 9 per group) and tumor growth was monitored two times a week in each group. Tumor volume was calculated by the formula $V = \frac{1}{2} (a \times b^2)$, where a is the longest tumor axis and b is the shortest tumor axis. When tumors reached 1 cm in diameter, mice were sacrificed and each tumor was fixed in formol and photographed.

Proximity ligation *in situ* assay (P-LISA)

MCF-7 cells were cultured for 24 h on coverslips and then fixed and permeabilized using cold methanol for 20 min at -20°C. P-LISA staining was performed according to the OlinkBioscience’s recommendations using Duolink® In Situ Detection Reagents Red kit (Sigma-Aldrich, DUO92008) and as previously described [51]. The number of red dots and the intensity per dots were counted using the Blobfinder software. 200 cells were randomly selected in 5 fields.

Transmission Electron microscopy

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

Flow cytometry

Cells were plated in 24-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C overnight following the different treatments. Cells were stained with MagicRed (Immunochemistry technologies) according to the manufacturer’s protocol or 50 nM LysoTracker® Green DND-26 (Life technologies, L-7526) for 45 min. After two PBS washes, cells were then trypsinized and

resuspended with 500 µl complete medium before being harvested at 5,000 g for 5 min and resuspended in 250 µl PBS. Cells (10,000 events) were then examined using a FC500 Beckman Coulter flow cytometer. Data were acquired and analyzed using the Flowing software.

Statistical analysis

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

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre-Yves Risold for his help and advices during immunofluorescence experiments and Christophe Houdayer for his technical help and advices during the preparation of tumor tissue slides (Plateau technique d’histopathologie, DIMaCell, Besançon). Authors also thank Sophie Launay (Plateau technique Imagerie Cellulaire et Tissulaire, DIMaCell, Besançon) and Valérie Perez for their technical help. We thank Dr. Elazar for kindly providing the pGFP-LC3 vector and Dr. Mehul Vora for critically reading of our manuscript. Laura Poillet-Perez was supported by a fellowship from the “Région de Franche-Comté” and this work was supported by a fellowship from the “Ligue contre le cancer” (Conférence de Coordination Inter Régionale Grand Est). We thank D.J. Shiwerski, R.K. Dagda, C.T. Chu for providing the “Green and Red puncta colocalization tool” designed for ImageJ.

CONFLICTS OF INTEREST

There are no financial disclosures from any authors.

REFERENCES

1. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22: 124-31. doi: 10.1016/j.ccb.2009.11.014 S0955-0674(09)00228-2.
2. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol.* 2012; 22: R29-34. doi: 10.1016/j.cub.2011.11.034 S0960-9822(11)01316-9.
3. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1102-9. doi: ncb1007-1102 10.1038/ncb1007-1102.
4. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 2014; 24: 24-41. doi: 10.1038/cr.2013.168 cr2013168
5. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic

- checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30: 214-26. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003 S1097-2765(08)00169-X.
6. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 36: 121-9. doi: 10.1016/j.semdb.2014.08.006 S1084-9521(14)00242-0.
 7. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 132-41. doi: 10.1038/ncb2152.
 8. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 2011; 331: 456-61. doi: 10.1126/science.1196371 science.1196371.
 9. Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*. 2011; 7: 643-4. doi:
 10. Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL. Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1993; 90: R17-21. doi:
 11. Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature*. 1999; 397: 69-72. doi: 10.1038/16264.
 12. Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J*. 2000; 19: 1494-504. doi: 10.1093/emboj/19.7.1494.
 13. Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, Dulieu P, Remy-Martin JP, Jouvenot M, Fraichard A. A novel early estrogen-regulated gene *gac1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 284: 118-25. doi: 10.1006/bbrc.2001.4908 S0006-291X(01)94908-3.
 14. Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325: 639-48. doi: S0006-291X(04)02315-0 10.1016/j.bbrc.2004.10.072.
 15. Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem*. 2006; 281: 7983-93. doi: M509805200 10.1074/jbc.M509805200.
 16. Seguin-Py S, Lucchi G, Croizier S, Chakrama FZ, Despouy G, Le Grand JN, Ducoroy P, Boireau W, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, Fraichard A, Delage-Mourroux R. Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein. *Biochimie*. 2012; 94: 748-58. doi: 10.1016/j.biochi.2011.11.006 S0300-9084(11)00422-6.
 17. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 2503-18. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.009 S1357272504002110.
 18. Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci*. 2009; 122: 2554-66. doi: 10.1242/jcs.046250 jcs.046250.
 19. Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 300: 637-44. doi: S0006291X02029078.
 20. Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem*. 2004; 279: 47704-10. doi: 10.1074/jbc.M407016200.
 21. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004; 117: 2805-12. doi: 10.1242/jcs.01131 117/13/2805.
 22. Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem*. 2004; 279: 36268-76. doi: 10.1074/jbc.M401461200 M401461200.
 23. Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy*. 2010; 6: 495-505. doi: 10.4161/auto.6.4.11819 11819.
 24. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*. 2010; 29: 1792-802. doi: 10.1038/emboj.2010.74 emboj201074.
 25. Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bole-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, Chakrama FZ, Fraichard A, Darley-Usmar VM, Despouy G, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Zhang J. The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy*. 2014; 10: 986-1003. doi: 10.4161/auto.28390 28390.
 26. Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Overvatn A, Kirkin V, Johansen T. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem*. 2012; 287: 39275-90. doi: 10.1074/jbc.M112.378109 M112.378109.
 27. Kraft C, Kijanska M, Kalie E, Siergiejuk E, Lee SS, Semplicio G, Stoffel I, Brezovich A, Verma M, Hansmann I, Ammerer G, Hofmann K, Tooze S, et al. Binding of

- the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J.* 2012; 31: 3691-703. doi: 10.1038/emboj.2012.225 emboj2012225.
28. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem.* 2011; 80: 125-56. doi: 10.1146/annurev-biochem-052709-094552.
 29. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282: 24131-45. doi: M702824200 10.1074/jbc.M702824200.
 30. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Overvatn A, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell.* 2009; 33: 505-16. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.020 S1097-2765(09)00064-1.
 31. Rozenknop A, Rogov VV, Rogova NY, Lohr F, Guntert P, Dikic I, Dotsch V. Characterization of the interaction of GABARAPL-1 with the LIR motif of NBR1. *J Mol Biol.* 2011; 410: 477-87. doi: 10.1016/j.jmb.2011.05.003 S0022-2836(11)00524-9.
 32. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 2010; 11: 45-51. doi: 10.1038/embor.2009.256 embor2009256.
 33. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem.* 2010; 285: 5941-53. doi: 10.1074/jbc.M109.039925 M109.039925.
 34. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013; 368: 651-62. doi: 10.1056/NEJMra1205406.
 35. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 5308-16. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5023 1078-0432.CCR-07-5023.
 36. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793: 1524-32. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.01.006 S0167-4889(09)00024-X.
 37. Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* 2014; 4C: 184-92. doi: S2213-2317(14)00127-X 10.1016/j.redox.2014.12.003.
 38. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 2007; 21: 1367-81. doi: gad.1545107 10.1101/gad.1545107.
 39. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007; 21: 1621-35. doi: 21/13/1621 10.1101/gad.1565707.
 40. Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, Petersen I. Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 394-400. doi: 65/2/394.
 41. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene.* 2012; 31: 4397-408. doi: 10.1038/onc.2011.613 onc2011613.
 42. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999; 402: 672-6. doi: 10.1038/45257.
 43. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 688-99. doi: ncb1426 10.1038/ncb1426.
 44. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol.* 2009; 217: 702-6. doi: 10.1002/path.2509.
 45. Brahim-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2011; 21: 67-72. doi: 10.1016/j.gde.2010.10.006 S0959-437X(10)00173-5.
 46. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 38-47. doi: 10.1038/nrc704.
 47. Berthier A, Seguin S, Saso 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, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2010; 102: 1024-31. doi: 10.1038/sj.bjc.6605568.
 48. Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Expression of gec1/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: predominance of gec1/GABARAPL1 in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 119: 216-9. doi: S0169328X03004339.
 49. Liu C, Xia Y, Jiang W, Liu Y, Yu L. Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for

- patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2014; 31: 2043-8. doi: 10.3892/or.2014.3096.
50. 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. GABARAPL1 negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 27: 503-12. doi: 10.1159/000329952000329952.
 51. Gauthier T, Claude-Taupin A, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Hervouet E. Proximity Ligation In situ Assay is a Powerful Tool to Monitor Specific ATG Protein Interactions following Autophagy Induction. *PLoS One.* 2015; 10: e0128701. doi: 10.1371/journal.pone.0128701PONE-D-15-11618.
 52. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy.* 2007; 3: 452-60. doi: 4451.
 53. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19: 5720-8. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.
 54. Zhou J, Tan SH, Nicolas V, Bauvy C, Yang ND, Zhang J, Xue Y, Codogno P, Shen HM. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Res.* 2013; 23: 508-23. doi: 10.1038/cr.2013.11cr201311.
 55. Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E. Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase-beta (CaMKK-beta). *J Biol Chem.* 2012; 287: 38625-36. doi: 10.1074/jbc.M112.365767.
 56. Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol.* 2016. doi: 10.1083/jcb.201607039.
 57. Lim J, Kim HW, Youdim MB, Rhyu IJ, Choe KM, Oh YJ. Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy.* 2011; 7: 51-60. doi: 13909.
 58. Gao W, Kang JH, Liao Y, Ding WX, Gambotto AA, Watkins SC, Liu YJ, Stolz DB, Yin XM. Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *J Biol Chem.* 2010; 285: 1371-83. doi: 10.1074/jbc.M109.054197 M109.054197.
 59. Tung YT, Hsu WM, Lee H, Huang WP, Liao YF. The evolutionarily conserved interaction between LC3 and p62 selectively mediates autophagy-dependent degradation of mutant huntingtin. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30: 795-806. doi: 10.1007/s10571-010-9507-y.
 60. Dunlop EA, Hunt DK, Acosta-Jaquez HA, Fingar DC, Tee AR. ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy.* 2011; 7: 737-47. doi: 15491.
 61. Joachim J, Jefferies HB, Razi M, Frith D, Snijders AP, Chakravarty P, Judith D, Tooze SA. Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130. *Mol Cell.* 2015; 60: 899-913. doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.018.
 62. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003; 115: 577-90. doi: S0092867403009292.
 63. Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy.* 2013; 9: 1407-17. doi: 10.4161/auto.25455.
 64. McEwan DG, Dikic I. PLEKHM1: Adapting to life at the lysosome. *Autophagy.* 2015; 0. doi: 10.1080/15548627.2015.1034419.
 65. 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, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell.* 2015; 57: 39-54. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.006S1097-2765(14)00871-5.
 66. Wang H, Sun HQ, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, Yin H. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 7015-20. doi: 10.1073/pnas.1507263112.
 67. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Pous C. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci.* 2013; 126: 1071-80. doi: 10.1242/jcs.115626 126/5/1071.
 68. Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem.* 2006; 281: 36303-16. doi: M607031200.
 69. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012; 149: 274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017S0092-8674(12)00351-0.
 70. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2013; 23: 53-62. doi: 10.1016/j.gde.2012.12.005S0959-437X(12)00149-9.
 71. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene.* 2006; 25: 6416-22. doi: 10.1038/sj.onc.1209888.
 72. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999; 59: 59-65. doi: 10.1006/geno.1999.5851 S0888-7543(99)95851-2.

73. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1809-20. doi: 10.1172/JCI20039.
74. Elgendy M, Ciro M, Abdel-Aziz AK, Belmonte G, Dal Zuffo R, Mercurio C, Miracco C, Lanfrancione L, Foiani M, Minucci S. Beclin 1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner. *Nat Commun.* 2014; 5: 5637. doi: 10.1038/ncomms6637.
75. Cicchini M, Chakrabarti R, Kongara S, Price S, Nahar R, Lozy F, Zhong H, Vazquez A, Kang Y, Karantza V. Autophagy regulator BECN1 suppresses mammary tumorigenesis driven by WNT1 activation and following parity. *Autophagy.* 2014; 10: 2036-52. doi: 10.4161/auto.34398.
76. Haan C, Behrmann I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods.* 2007; 318: 11-9. doi: S0022-1759(06)00294-8 10.1016/j.jim.2006.07.027.
77. Morel C, Adami P, Musard JF, Duval D, Radom J, Jouvenot M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 3971-82. doi: S0014-4827(07)00428-4 10.1016/j.yexcr.2007.09.003.

Publication II :

GABARAPL1 inhibits EMT through the degradation of SMAD by autophagy

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick fraichard, Michaël Herfs, Michaël Guittaut and Gilles Despouy

Sera soumis début 2020 dans le journal Oncogene

1 GABARAPL1 inhibits EMT through the degradation of SMAD by autophagy

2

3 Marine Jacquet,¹ Jean-René Pallandre¹, Eric Hervouet^{1,2}, Jean-Paul Feugeas¹, Michaël Herfs³, Borg

4 Christophe^{1,4,5}, Michaël Guittaut^{1,2}, Annick Fraichard¹ and Gilles Despouy^{1,*}

5

6

7 ¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-
8 Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France.

9 ² DImaCell platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.

10 ³ Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, 4000, Liege, Belgium.

11 ⁴ University Hospital of Besançon ou Hôpital Universitaire de Besançon, Department of medical
12 oncology, F-25000 Besançon, France

13 ⁵ INSERM CIC-1431, University Hospital of Besançon ou Hôpital Universitaire de Besançon, clinical
14 Investigation Center in Biotherapy, F-25000 Besançon, France

15

16

17 *** Corresponding author:**

18 Dr. Gilles Despouy, gilles.despouy@univ-fcomte.fr

19 Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-
20 Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France.

21

22

23 Abstract

24 The epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been associated with an increase of the
25 aggressiveness of the cancer cell because of its involvement in motility acquisition properties,
26 metastasis formation, immune system escape and drug resistance explaining that targeting EMT
27 might be a new anti-cancer therapeutic strategy. EMT is a complex and reversible pathway mainly
28 induced by TGF β founded in the tumor microenvironment and controlled by several signaling
29 pathway, such as SMAD. Autophagy, a catabolic pathway permitting the degradation of misfolded
30 proteins or damaged organelles, has been previously described as involved in the EMT regulation.
31 During autophagy, more than 50 ATG proteins are involved and among them, the ATG8 proteins. The
32 ATG8 is composed of two subfamilies GABARAP (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2) and LC3 (LC3A,
33 LC3B and LC3C) which can regulate several steps of autophagy and can participate to selective
34 autophagy to permit the targeted elimination of a specific protein. Here, we founded that amongst
35 the ATG8 proteins, *GABARAPL1* expression was correlated with EMT markers in human lung
36 adenocarcinoma tumors and that GABARAPL1 protein levels were increased in mesenchymal human
37 lung adenocarcinoma tumors compared to the epithelial one. We then studied the implication of
38 GABARAPL1 in EMT and we founded that GABARAPL1 can inhibit EMT through its role in autophagy-
39 related degradation of SMAD proteins.

40

41 Introduction

42 Lung cancer is the main cause of cancer-related deaths nowadays and this high rate of
43 mortality can be explained by the apparition of metastasis in several organs such as brain (1). Cancer
44 metastasis is a multistep process involving the migration of cancer cells from the primary tumor to
45 join the blood circulation and then to colonize a distant site to form a secondary tumor (2). The
46 epithelial to mesenchymal transition (EMT) has been shown to play a major role during cancer cell

2

47 metastasis but also during the escape of the immune system by cancer cells, the acquisition of
48 apoptosis resistance and the gain of cellular stemness properties leading to anti-cancer drug
49 resistance (3) explaining why targeting EMT emerged as a new anti-cancer therapeutic strategy. EMT
50 is a plastic and reversible biological process induced by cellular stresses and growth factors founded
51 in the tumoral microenvironment such as the TGF β , which is the most described growth factor
52 involved in EMT induction. TGF β activates the SMAD2/SMAD3/SMAD4 and SMAD-independent
53 signaling pathway triggering the activation of EMT transcription factors (EMT-TFs) such as SNAIL,
54 TWIST and ZEB. EMT-TFs downregulate key epithelial genes (*e.g. E-Cadherin/CDH1*) and up-regulate
55 key mesenchymal genes (*e.g. N-Cadherin/CDH2, Vimentin*)(4) leading to the acquisition of
56 mesenchymal cell properties, such as migratory and invasive abilities, a spindle-shaped morphology
57 and self-renewal capacity (5).

58 Macroautophagy (hereafter referred as autophagy) is a catabolic pathway where misfolded
59 or damaged proteins and/or organelles are sequestered into autophagosomes and delivered to
60 lysosomes inducing their hydrolytic degradation and recycling (6,7). Autophagy has been firstly
61 described as a non-selective degradation pathway but different types of selective autophagy has
62 been discovered since (Ubiquitinated proteins, mitophagy, aggrephagy...)(8–10). Selective
63 autophagy involves the family of ATG8 proteins (Autophagy-related 8) composed of two subfamilies:
64 the GABARAP subfamily (GABA type A receptor-associated protein) comprising 3 members
65 (GABARAP, GABARAPL1 (GABARAP-like 1) and GABARAPL2 (GABARAP-like 2)) and the MAP-LC3
66 subfamily (Microtubule-associated protein light chain 3), commonly called LC3, comprising 3
67 members (LC3A, LC3B and LC3C)(11–18). During selective autophagy, ATG8s are recruited and
68 conjugated to a phospholipid onto the autophagosome membrane and can function as anchor points
69 to specifically recruit the selected proteins/organelle to degrade. This recruitment requires an
70 autophagy adaptors containing the conserved AIM sequence (ATG8 interacting motif) founded in

71 these proteins (19,20). These ATG8 proteins are also implicated in the non-selective autophagy
72 through the regulation of key steps of the autophagy pathway: initiation, elongation,
73 autophagosomes transport and autophagosome/lysosome fusion (21).

74 Autophagy has been described to present a double-edge sword in cancer. First, the anti-
75 tumoral autophagy maintains cellular homeostasis and the genome stability which inhibit cellular
76 transformation. During cancer progression, autophagy can act as an anti-tumoral process by the
77 degradation of proteins associated with tumor progression but autophagy can also present a pro-
78 tumoral function by producing nutrient intake and preserving cancer cells from stress-induced death
79 (22). Regarding EMT, autophagy also presents a double-edge sword in EMT and the role of autophagy
80 during metastasis still remains unclear. On the one hand, EMT requires autophagy to sustain the
81 viability of the metastatic cells but, on the other hand, autophagy may prevent EMT through the
82 degradation of EMT factors (23–25).

83 In this work we were interested in the function of GABARAP proteins during EMT and to do
84 so, we investigated i) The correlation of ATG8 mRNA and protein levels with EMT markers in human
85 lung adenocarcinoma tumors, ii) we studied the response of *ATG8* genes expression to TGFβ-induced
86 EMT in cellular models and iii) we analyzed the involvement of GABARAPL1 during EMT in cancer
87 cells *in vitro*.

88 Results

89 ***GABARAPL1 expression was correlated with EMT markers***

90 To investigate whether the ATG8 genes might be involved in EMT in lung adenocarcinoma
91 tumors, 372 transcriptomes of lung adenocarcinomas were collected from the TCGA database and
92 correlations between autophagy- and EMT-related genes were studied with principal component
93 analysis. The correlation circle showed that *ATG8* genes expression (*GABARAP*, *GABARAPL1*,
94 *GABARAPL2*, *LC3B*) was rather positively associated with the expression of EMT-related genes and

95 negatively correlated with the expression of the epithelial marker, *CDH1*. Yet, amongst *ATG8* genes,
96 *GABARAPL1* and *LC3B* were the only *ATG8* genes positively associated with both the mesenchymal
97 marker *Vimentin* and the EMT-related transcription factors (*SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, *ZEB2*) but also
98 negatively correlated with the epithelial marker, *CDH1*. *GABARAPL1* provided the most significant
99 correlation with EMT-TFs and mesenchymal markers (Figure 1A). Then, we investigated the protein
100 levels of GABARAP and GABARAPL1 using immunohistochemistry in 60 samples of epithelial and
101 mesenchymal lung adenocarcinoma tumors. First, tumors were scored and classified using the
102 staining of Vimentin, as epithelial tumors with a low Vimentin staining (EMT-, 30 tumors) and
103 mesenchymal tumors with a high Vimentin staining (EMT+, 30 tumors). Then, epithelial and
104 mesenchymal tumors were analyzed for GABARAP and GABARAPL1 stainings. No significant
105 differences in GABARAP stainings between epithelial and mesenchymal tumors have been observed.
106 However, more interestingly, mesenchymal tumors presented a more intense GABARAPL1 staining
107 than the one observed in epithelial tumors (Figure 1B). These results therefore demonstrated that
108 GABARAPL1 expression is correlated with EMT markers at the mRNA and the protein levels in human
109 lung adenocarcinoma tumors.

110 ***TGFβ/TNFα-induced EMT was correlated with increased GABARAPL1 expression***

111 In a previous study (26), A549 lung adenocarcinoma cells, ACHN kidney adenocarcinoma cells
112 derived from metastatic pleural site and MCF10A breast immortalized cells were induced in EMT
113 using a TGFβ/TNFα treatment for 5 days and genes expression was analyzed using microarray
114 protocols. After 5 days of TGFβ/TNFα-induced EMT, cells presented a mesenchymal phenotype and
115 it was observed that TGFβ/TNFα-induced EMT led to a high increase in *GABARAPL1* levels (about 3-
116 fold) whereas only light differences have been detected for the others *ATG8s* in A549 cells (Figure 2A)
117 and similar results have been described in MCF10A cells (Figure S1). Surprisingly, in ACHN cells, only
118 a weakly significant increase of *LC3B* levels have been observed (Figure 2A). We then wanted to

119 analyze what was happening during the early times of EMT induction. Quantitative RT-PCR
120 experiments have shown that *GABARAPL1* was highly increased from 10 to 24 hours of TGF β /TNF α
121 treatment in A549 cells while only a weak increase of *GABARAPL2* and *LC3B* has been observed
122 (Figure 2B). These results suggested that, during TGF β /TNF α -induced EMT, *GABARAPL1* was the most
123 regulated gene amongst the *ATG8* gene family during EMT and that the induction of *GABARAPL1*
124 levels seemed to be an early response to TGF β /TNF α treatment.

125 To characterize the role of *GABARAPL1* during EMT, we have designed A549 KO *GABARAPL1*
126 and ACHN KO *GABARAPL1* (KO GL1) cell lines using the CRISPR/Cas9 genome editing technology to
127 disrupt the *GABARAPL1* encoding gene. We then selected two clones A549 KO GL1 (c1 and c3) and
128 two clones ACHN KO GL1 (cA and cB) in which the extinction of *GABARAPL1* has been confirmed by
129 immunoblotting in the presence or absence of the inhibitor of autolysosome degradation, NH₄Cl. The
130 control cell lines, A549c and ACHNc have been designed using a CRISPR/Cas9 control and were
131 derived from polyclonal cultures (Figure 3A). We first confirmed that the invalidation of *GABARAPL1*
132 was not compensated by the overexpression of the other main *ATG8* members, *GABARAP*,
133 *GABARAPL2* and *LC3B* at the protein and mRNA levels (Figure S2A, S2B).

134 ***The GABARAPL1 knock-out did not modify the autophagy flux***

135 To assess the impact of the invalidation of *GABARAPL1* on basal autophagy, we evaluated the
136 levels of LC3B-II by Western blotting experiment. Since, the LC3B-II levels are directly correlated to
137 the number of autophagosomes at a particular time point (27), it is now widely accepted that an
138 increase of LC3B-II can either represent an increase of autophagy induction and vesicle formation or
139 an inhibition of autolysosomes degradation but is not directly related to autophagy flux. To study
140 autophagy flux, we therefore compared LC3B-II levels in presence or absence of NH₄Cl, an inhibitor
141 of autophagosome-lysosome fusion. Our data showed that the levels of LC3B-II were equivalent
142 between the untreated control cells lines, A549c and ACHNc and KO cell lines, A549 KO GL1 and

143 ACHN KO GL1. Following, NH₄Cl treatment, we observed an equivalent accumulation of LC3B-II in
144 control and KO GL1 cells (Figure 3B). These results therefore demonstrated that GABARAPL1 was not
145 involved in basal autophagy flux in A549 and ACHN cells. In order, to confirm these results, we used
146 the double tagged GFP-RFP-LC3 construct and studied the effect of GABARAPL1 invalidation on
147 autophagosome and autolysosome numbers (28). GFP fluorescence is sensitive to acidic and
148 proteolytic conditions found in lysosomes but RFP fluorescence is not. This construct allows the
149 discrimination of autophagosomes (RFP+/GFP+, yellow) and autolysosomes (RFP+/GFP-, red). We
150 have founded that the invalidation of GABARAPL1 did not modify the number of autophagosomes
151 and autolysosomes (Figure 3C) confirming that the invalidation of GABARAPL1 does not modify the
152 autophagy flux in A549 cells.

153 ***GABARAPL1 knock-out led to the induction of EMT***

154 We then asked whether GABARAPL1 could regulate EMT. During EMT, cells adopt a
155 fibroblastic spindle sharp morphology (3), we then analyzed the area of the A549c and KO
156 GABARAPL1 cells and we observed that KO GABARAPL1 cells have a slightly but significantly higher
157 area than the control A549c cells (Figure 4A). Next, we analyzed the expression of two well described
158 EMT markers: the mesenchymal marker CDH2/N-Cadherin and the epithelial marker CDH1/E-
159 Cadherin. In our models, we then induced EMT using a combination of TGFβ, a growth factor
160 currently used to induce EMT and TNFα, a compound described to enhance the effect of TGFβ. Firstly,
161 without treatment, we observed that CDH2/N-Cadherin was increased, and that the CDH1/E-
162 Cadherin was decreased in A549 KO GL1 cells compared to A549c cells suggesting that the KO GL1
163 cell lines can enter EMT without treatment. After a 24-hours treatment of TGFβ/TNFα, we detected
164 an equivalent increase of the CDH2/N-Cadherin levels in A549c and in A549 KO GL1 cells. However,
165 a decrease of the CDH1/E-Cadherin marker was indeed observed in the A549c cells, as expected, but
166 not in the A549 KO GL1 cells (Figure 4B). Next, we analyzed whether the *CDH2/N-Cadherin* and

167 *CDH1/E-Cadherin* genes were modulated at the mRNA level and we observed that, in non-treated
168 cells, the A549 KO GL1 cells presented an increase of *CDH2/N-Cadherin* mRNA levels and a decrease
169 of *CDH1/E-Cadherin* mRNA levels compare to the control A549c cells. Similarly, in ACHN cells, the
170 levels of *CDH2/N-cadherin* mRNA were increased in the ACHN KO GL1 cells compares to the ACHNc
171 control cells, but in a non-significative way in the ACHN KO GL1 cB cells. For the *CDH1/E-Cadherin*
172 mRNA levels, we showed that their levels were not modified in ACHN KO GL1 cA cells but were
173 decreased in the ACHN KO GL1 cB cells. After a TGFβ/TNFα treatment, *CDH2/N-Cadherin* mRNAs
174 were increased and *CDH1/E-Cadherin* mRNAs were decreased in A549c, A549 KO GL1 and ACHNc but
175 not in the ACHN KO GL1 cells (Figure 4C). Altogether, these results suggested that GABARAPL1 indeed
176 inhibited EMT through the transcriptional regulation of EMT-related genes and that, the A549 KO
177 GL1 cells but not the ACHN KO GL1 cells were still able to be induced in EMT by TGFβ/TNFα
178 treatment, even if they already express mesenchymal markers without any induction.

179 ***The GABARAPL1 knock out led to an increase of SNAI1 levels***

180 Since the invalidation of GABARAPL1 resulted in an up-regulation of the EMT program through
181 the transcriptional down-regulation of *CDH1/E-Cadherin* and the up-regulation of *CDH2/N-Cadherin*,
182 we asked whether GABARAPL1 could regulate others EMT-related genes transcription. Several EMT-
183 related transcription factors are known to be involved in EMT, such as SNAI1, TWIST and ZEB1. In
184 A549 cells, we showed that during 10 to 24 hours of TGFβ/TNFα-induced EMT, *SNAI1* was the gene
185 showing the highest increase in expression whereas the others were less induced (Figure S3A). We
186 then analyzed SNAI1 proteins amounts in A549c and KO GL1 cells and we described that the levels of
187 the SNAI1 protein were greatly increased in A549 KO GL1 cells compared to the A549c controls cells
188 (Figure 5A). However, the amounts of TWIST were not modified (Figure S3B) suggesting the main
189 implication of SNAI1 in the regulation of the induction of EMT in the A549 cells. The SNAI1 and TWIST
190 transcription factors have been previously shown to be degraded by autophagy process in murine

191 hepatocytes and that this degradation may involve selective autophagy suggested by the interaction
192 described between SNAI1 and p62, an autophagy adaptator, in autophagosomes (24,29). We
193 therefore hypothesized that GABARAPL1 might induce SNAI1 degradation by the selective
194 autophagy. To confirm this hypothesis, we analyzed SNAI1 protein levels in A549c in presence of the
195 inhibitor of autophagosome degradation, NH₄Cl, and we indeed showed that there is an
196 accumulation of SNAI1 confirming that SNAI1 could be degraded by autophagy. However, in A549 KO
197 GL1 cells, the use of NH₄Cl has also led to the same accumulation of SNAI1 suggesting that
198 GABARAPL1 was not directly involved in SNAI1 degradation in A549 cells. Moreover, the SNAI1
199 protein increase observed in A549 KO GL1 cells compared to the control A548c cells does probably
200 not involve a decrease of its degradation by autophagy in these cells (Figure 5B). We then analyzed,
201 *SNAI1* mRNA levels in A549c, ACHNc and KO GL1 cells. Without any treatment, we described that
202 *SNAI1* mRNA levels were increased in A549 and ACHN KO GL1 cells compared to control cells (Figure
203 5C), whereas the stability of the *SNAI1* mRNA was not modified (Figure S3C). Then, we quantified
204 that TGFβ/TNFα-induced EMT led to an increase of SNAI1 mRNA and proteins levels in control and
205 KO GL1 cells (Figures S2D, S2E) confirming that KO GL1 cells were still inducible in EMT. These results
206 suggested that in KO GL1 cells, *SNAI1* was transcriptionally up-regulated and leading to the increase
207 of SNAI1 protein levels and probably to the increase of *CDH2/N-Cadherin* expression and the
208 decrease of *CDH1/E-Cadherin* expression.

209 ***GABARAPL1 induced the degradation of SMAD by autophagy***

210 Since the invalidation of GABARAPL1 lead to an increase of *SNAI1* expression, we analyzed the
211 SMAD signaling pathway which has been extensively described to be involved in *SNAI1* transcription
212 regulation. During the EMT process, the TGFβ receptor, following its activation by the TGFβ,
213 phosphorylates SMAD2 and SMAD3, which, after their dimerization, recruit SMAD4. Then, the
214 protein complex is translocated to the nucleus and acts as a transcription factor up-regulating EMT

215 genes such as *SNAI1* (30). We therefore decided to study SMAD2, SMAD3 and SMAD4 basal protein
216 levels and we described that their levels were increased in A549 KO GL1 cells compared to A549c
217 cells. Similarly, we showed that SMAD4 was increased in ACHN KO GL1 cells compared to ACHNc
218 cells, but no differences in SMAD2 and SMAD3 levels were detected (Figures 6 and S4A). Even if the
219 increase in SMAD protein levels were not correlated with mRNA levels, we still detected a slight
220 increase of *SMAD2* mRNA levels but only in the A549 KO GL1 c1 cells (Figure 6B). We therefore
221 suggested that this increase in SMAD proteins levels could be the explanation for the increase in
222 *SNAI1* mRNA levels. We then hypothesized that the increase of the SMAD protein levels in A549 and
223 ACHN KO GL1 cells may be explained by a decrease of their degradation by autophagy. To confirm
224 this hypothesis, we then inhibited autophagy degradation and quantified SMAD2 and SMAD3 in
225 control A549c cells and we observed that the NH₄Cl treatment led to an accumulation of SMAD2 and
226 SMAD3 in control A549c cells, but not in A549 KO GL1 cells (Figure 6C). Similarly, the NH₄Cl treatment
227 led to an accumulation of SMAD4 in control ACHNc cells but not in ACHN KO GL1 cells. These results
228 suggested an inhibition of the degradation of SMAD2 and SMAD3 by autophagy in A549 KO GL1 cells
229 and an inhibition of the degradation of SMAD4 by autophagy in ACHN KO GL1 cells. Since we
230 observed a decrease of the degradation of SMADs by autophagy in the KO GL1 cells without any
231 modification of their autophagy flux, we suggested that SMADs may be degraded through
232 GABARAP1-mediated selective autophagy. This hypothesis was corroborated by the analysis of the
233 amino acids sequences of SMADs using the iLIR Autophagy Database which showed that SMAD2 may
234 contain 7 potential AIM sequences, and that SMAD3 and SMAD4 may contain 8 potential AIM
235 sequences each (31).

236 ***GABARAP1 inhibited cellular proliferation and invasion***

237 The aggressiveness of cancer cells came from their ability to proliferate and to invade tissue.
238 Since GABARAP1 have been previously described as a tumor suppressor gene in breast cancer and

239 in hepatocellular carcinoma cell lines (32–34), we therefore studied the effect of the invalidation of
240 GABARAPL1 in our lung adenocarcinoma cell line A549 and we observed that the A549 KO
241 GABARAPL1 cells were more proliferative than the control A549c cells (Figure 7A). During EMT,
242 cancer cells acquire mobility properties, we then wondered about the impact of the invalidation of
243 GABARAPL1 on invasiveness and as expected we founded that A549 KO GABARAPL1 cells were more
244 invasive than the control A549c cells (Figure 7B) probably explained by the decrease of the E-
245 Cadherin/CDH1 levels involved in cellular junction and tissue organization and the increase of the N-
246 Cadherin/CDH2 levels involved in cell migration.

247 Discussion and conclusion

248 Autophagy is a catabolic intracellular process which permits the recycling of damaged
249 organelles and/or proteins to maintain healthy cell homeostasis. However, cancer cells can hijack
250 autophagy to recycle nutrients necessary for their hyperactive metabolism and to escape from stress-
251 induced cell death (22). The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) process has been described as
252 implicated in the acquisition of aggressiveness of cancer cells and previous works have shown that
253 autophagy can induce EMT in bladder cancer, glioma but also inhibits EMT in lung adenocarcinoma,
254 glioblastoma, breast cancer or colon cancer (23–25,35,36). The antitumor role of the autophagy is
255 mainly linked to the degradation of several oncogenic proteins or damaged organelles by the ATG8-
256 mediated selective autophagy explaining that study ATG8 proteins in cancer might be interesting.

257 *ATG8* gene expression has been poorly studied in cancer however, several studies showed
258 that the expression of the *GABARAP* subfamily is mainly downregulated in cancer compare to healthy
259 tissue, their low expression can correlate with more advanced stages in breast cancer and appeared
260 to be a poor prognosis factors in liver, prostate, neuroblastoma and pancreatic cancers (34,37–40).
261 However, the expression of the LC3 proteins appeared to be more dependent of the tumor types
262 suggesting a specific regulation of each *ATG8* gene expression. Surprisingly, we founded that

263 amongst the ATG8, *GABARAPL1* is the most correlated gene with the EMT markers in lung
264 adenocarcinoma tumors and *GABARAPL1* is highly expressed in the more aggressive mesenchymal
265 tumors compared to the epithelial ones. Our observations have been confirmed using transcriptome
266 analysis of 5-days TGF β /TNF α -induced EMT showing that the *ATG8* gene expressions are modulated
267 during EMT but among them, *GABARAPL1* appeared to be the most induced gene in lung
268 adenocarcinoma A549 cells and in breast immortalized MCF10A cells. However, in the kidney
269 adenocarcinoma ACHN cells, the expression of only *LC3B* was in fact increased. These results might
270 be explained because A549 and MCF10A untreated cells presented low levels of *GABARAPL1* while
271 the ACHN presented high levels of *GABARAPL1* explaining that its expression might not be further
272 increased. Because *GABARAPL1* appeared to be the most ATG8 gene regulated during EMT, we
273 wanted to determine if *GABARAPL1* can have a role in EMT.

274 Autophagy can inhibit EMT through the degradation of EMT inducer such as the TGF β (41)
275 and EMT actors such as *SNAI1* and *TWIST* (23–25). It has been previously shown that LC3-mediated
276 selective autophagy can degrade *SNAI1* (42) and we founded that *GABARAPL1*-mediated autophagy
277 can also inhibit EMT by its implication in autophagy-linked SMADs degradation. The
278 *SMAD2/SMAD3/SMAD4* signaling pathway has been previously described as the main driver of TGF β -
279 induced EMT. It specifically induces the expression of EMT-TFs such as *SNAI1* and *TWIST*, which can
280 act as transcriptional repressors of epithelial gene *e.g. CDH1/E-Cadherin* and transcriptional inducers
281 of mesenchymal gene *e.g. CDH2/N-Cadherin* (43). Indeed, in our A549 and ACHN cell models, the
282 invalidation of *GABARAPL1* inhibited SMAD degradation by autophagy, observation which explained
283 the increase of SMAD and therefore the increase in *SNAI1* transcription and cell invasion. Surprisingly,
284 the invalidation of *GABARAPL1* do not modify the level of *TWIST* proteins suggesting that *SNAI1* might
285 be the main EMT-related transcription factor involved in TGF β /TNF α -induced EMT. Indeed, upon

286 TGFβ/TNFα treatment, *SNAI1* expression is greatly increased whereas *TWIST* and *ZEB* expressions
287 appeared to be slightly modified in A549.

288 Even if the tumor suppressor role of *GABARAPL1* can be independent of its role in selective
289 autophagy (34,44) and might involve its implication in the regulation of signaling pathway (45,46),
290 our results are in agreement with previous work showing that ATG8 tumor suppressive function can
291 also be linked to their implication in oncogenic proteins degradation by selective autophagy (33,47).
292 During selective autophagy, ATG8 proteins recruits targeted proteins by their AIM motif (ATG8-
293 interacting motif) to induce their degradation (48). Bioinformatic analysis showed that SMAD
294 proteins contain multiple potential AIM motifs suggesting that these proteins might indeed be
295 selectively degraded by autophagy (31) leading to the inhibition of the SMAD signaling pathway and
296 therefore EMT. We also suggested that the degradation of SMADs by the autophagy process might
297 be an EMT negative regulatory loop. Indeed, *GABARAPL1* is increased during EMT and lead to the
298 inhibition of EMT. Similarly, previous studies have reported that autophagy genes, such as *BECN1*
299 and *ATG7* are increased during TGFβ-induced EMT through the SMAD signaling pathway (49). Indeed,
300 bioinformatics analysis showed that the SMAD might targeted the *GABARAPL1* promotor and
301 therefore might induce *GABARAPL1* expression. Further analysis will determine if SMAD proteins can
302 indeed regulate *GABARAPL1* expression during EMT.

303 EMT is involved in the acquisition of aggressiveness properties by the cancer cells and has
304 been described to be involved in metastasis formation, immune system escape and also drug
305 resistance (50–52). Given the role of *GABARAPL1* as a tumor suppressor such as in tumor growth
306 (33,44) and EMT, it will be interested to study the role of *GABARAPL1* in these EMT-linked cancer
307 cells phenotypes.

308 In this study we confirmed that autophagy can negatively regulate EMT through EMT-related
309 factors degradation. For the first time we showed that *GABARAPL1* expression is correlated with EMT

310 markers in human lung adenocarcinoma tumors and might act as an EMT negative regulator through
311 its implication in SMAD proteins degradation by autophagy suggesting that *GABARAPL1* can
312 negatively regulate EMT.

313

314 **Materials and methods**

315 ***Transcriptome analysis***

316 We used the R software (version 3.6.0) (<http://www.R-project.org/>) to collect dataset and to
317 carry out all statistical analyses. Computations were performed on the supercomputer facilities of
318 the "Mésocentre de calcul de Franche-Comté" (Besançon, France). 594 transcriptomes produced by
319 RNAseq were collected from The Cancer Genome Atlas (TCGA) website
320 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) using the TCGAbiolinks R-package. Downloaded HT-seq count files
321 were normalized using the "Deseq-2" R package, using the function
322 "varianceStabilizingTransformation". For subsequent analyses, we retained 372 samples diagnosed
323 as NOS adenocarcinoma. Correlations between autophagy- and EMT-related genes were globally
324 analyzed by principal component analysis using the FactoMineR package. Correlation circle was
325 drawn using this package. Pearson correlation coefficients (r) were calculated to quantify two-by-two
326 correlations.

327 ***Reagent and antibodies***

328 NH_4Cl (A0171, Sigma Aldrich), TGF β (100-21, Peprotech), TNF α (300-01A, Peprotech) and
329 Actinomycin D (EU0450-B, Euromedex) were used. For the Western blotting experiments, the
330 following antibodies were used: GABARAPL1 (26632S, cell signaling), GABARAP/L1 (AB15278,
331 Chemicon Milipore), GABARAPL2 (18724-1-AP, Proteintech), LC3 (LB8918, Sigma), N-Cadherin
332 (D4R1H, Cell Signaling), E-Cadherin (610181, BD Biosciences), SNAI1 (C15D3, Cell Signaling),
333 TWIST1/2 (GTX127310, GeneTex) SMAD2 (5339T, Cell Signaling), SMAD3 (9523T, Cell Signaling),

14

334 SMAD4 (38454T, Cell Signaling), β -actin (A5060, Sigma Aldrich), anti-rabbit (BI2413C, P.A.R.I.S) and
335 anti-mouse (BI2407, P.A.R.I.S) were used. For IHC experiments, the following antibodies were used:
336 Vimentin (#7902917, Ventana Medical Systems), GABARAP (SAB1302861, Sigma Aldrich) and
337 GABARAPL1 (11010-1-AP, Protein tech). For confocal microscope experiment, actin was labeled using
338 phalloidin (P1951, Sigma Aldrich).

339 ***Tissue samples and immunohistochemistry (IHC)***

340 Paraffin-embedded tissue biopsies of NSCLCs were collected in the collaboration with the
341 Tissue Biobank of the University of Liege (Liege, Belgium). This protocol was approved by the Ethics
342 Committee of the University Hospital of Liege. The initial diagnosis of each case was confirmed by
343 experienced histopathologists. IHC analysis was performed using a standard protocol (53). Following,
344 IHC, samples were classified into two groups: EMT-positive and EMT-negative in regards of the
345 intensity of the score of the Vimentin staining (0-3) and the extent of the staining (0-3). As previously
346 described (54) the 2 scores were multiplied to obtain a global score ranged from 0 to 9. All immune-
347 labeled tissues were evaluated by two experienced histopathologists.

348 ***Cell culture and treatments***

349 A549 (lung adenocarcinoma, ATCC CCL-185) and ACHN (kidney adenocarcinoma, ATCC CRL-
350 1611) cancer cells were cultured in DMEM 1g/l glucose (L0066, Dominique Dutscher) supplemented
351 with 10% FBS (702774C, Corning) supplemented by 100 μ g/mL penicillin/streptomycin (PAA, P11-010)
352 in a 5% CO₂ incubator at 37°C. To inhibit autophagy, cells were treated with 50 mM NH₄Cl for 2 h. To
353 induce EMT, cells were co-treated with 5 ng/ml TGF β and 20 ng/ml TNF α from 10 to 24 h. To study
354 mRNA stability, cells were incubated with 2,5 μ g/ml Actinomycin D from 15 min to 4 h.

355 For transient transfection, the pCAS9-GFP or the pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1 plasmids
356 were kindly provided by Dr. Vigneron (CNRS-UMR7242, Strasbourg). Plasmids were transfected using
357 the Jetprime reagent (Polyplus transfection, 114-07) according to the manufacturer's protocol.

358 **Generation of KO cell lines using the CRISPR/Cas9 gene editing technology**

359 A549 KO GABARAPL1 cell lines were generated using the CRISPR/Cas9 gene editing
360 technology. A549 wild type cells were transfected with the pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1a or the
361 pCAS9-GFP-sgRNA GABARAPL1b targeting two distinct sites of the first exon of GABARAPL1 leading
362 to the generation of the A549 KO GABARAPL1 c1 (A549 KO GL1 c1) and A549 KO GABARAPL1 c3 (A549
363 KO GL1 c3) cell lines respectively. ACHN wild type cells were transfected with the pCAS9-GFP-sgRNA
364 GABARAPL1b plasmid leading to the generation of the ACHN KO GABARAPL1 cA and ACHN KO
365 GABARAPL1 cB cell lines respectively. A549c and ACHNc cells were generated following transfection
366 with the pCAS9-GFP-sgRNA control plasmid. The day after transfection, GFP-positive cells were
367 sorted by FACS (SH800, SONY) and colonies were expanded before being screened for the loss of
368 GABARAPL1 expression by Western blotting. For A549c and ACHNc control cells all the GFP-positive
369 cells have been pooled and, therefore, these cell lines correspond to polyclonal cell lines.

370 **Cell proliferation**

371 A549 cells were plated in 96-well plates at a density of 1500 cells/well. Cell proliferation
372 experiments were then conducted for 5 days using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl
373 tetrazoliumbromide] (Sigma-Aldrich, M2128). Each day, after removing the cell supernatant, 100 μ l
374 of a 100 mM MTT solution in PBS were added to the cells. After a 2-hour incubation at 37°C and 5%
375 CO₂, formazan crystals were dissolved in 50 μ l DMSO (dimethyl sulfoxide)(Euromedex, UD8050-A)
376 and the absorbance was quantified at 549 nm using microplate reader (Multiskan FC,
377 ThermoScientific).

378 **Cell invasion assays**

379 Cell invasion was evaluated using modified Boyden chambers (ThinCert for 24 well plates, 8
380 μ m pore size, Greiner Bio-one, 438122). Boyden chambers were coated with 50 μ l of ECM (extra
381 cellular matrix) gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma-Aldrich, E1270, 1mg/ml)

382 diluted in DMEM for 5 h at 37°C. A total of 100 000 cells in 150 µl of serum-free DMEM were seeded
383 into the upper chamber and 500 µl of complete culture medium was added in the lower
384 compartment. After a 24-hour incubation in a 5% CO₂ atmosphere at 37 C°, cells in the upper
385 compartment were removed. Then, cells in the lower compartment and cells which have streamed
386 across the membrane, were rinsed with PBS, fixed for 5 min with absolute ethanol, then stained with
387 crystal violet (0.5% in 2% ethanol) for 10 min. Filters and wells were then washed with distilled water
388 and cell density was counted on pictures taken with the EvosXL Core microscope.

389 **Western blotting**

390 Cells were washed by adding cold PBS and then scraped and lysed in SB 1X (45 mM Tris- HCl,
391 pH 7.6, 10% Glycerol, 2% SDS, 1.5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) or RIPA (50 mM
392 Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X100, 0.5 % DOCA, 0.1 % SDS) buffer supplemented with 1X
393 protease inhibitors (P8340, Sigma Aldrich). Proteins lysates were sonicated for 5 s and boild to 95°C
394 for 5 min and then loaded on a 4-12% TGX Gel (TGX TM FastCast TM Acrylamid solution, Biorad)
395 according to the manufacturer's instructions. Proteins were transferred onto a polyvinylidene
396 difluoride (PVDF) membrane (162-0177, Biorad). The membrane was blocked with 5% nonfat milk or
397 BSA (Bovin Serum Albumin) in Tris-buffered saline with Tween 20 (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 137 mM
398 NaCl 0,1% Tween 20) and incubated with primary antibodies as overnight at 4°C. Membrane were
399 washed 3 times with TBS-Tween 20 0,1%, incubated with secondary anti-rabbit or anti-mouse HRP
400 conjugated antibody according to the manufacturer's instruction (BI2407, BI2413C,
401 P.A.R.I.S.,France). The membrane was then washed 3 times with TBS-Tween 20 0,1% and incubated
402 with Clarity Western Cl substrate (1705051, Biorad) and chemiluminescence was monitored using
403 Biorad ChemiDoc™ XRS+.

404 **Quantitative RT-PCR**

405 Total RNAs were isolated from cells using the Tri Reagent (Molecular Research Center, TR-
 406 118) as described by the manufacturer. Reverse transcription was performed using M-MLV (M-1302,
 407 Sigma Aldrich) reverse transcriptase and 2 µg of total RNA. Quantitative PCR (qPCR) were performed
 408 in triplicate using Step one real-Time PCR system (Applied Biosystems) and the SYBER qPCR Premix
 409 Es Taq (Tli RNase H Plu (TAKRR420W, Takara) according to manufacturer's instructions. The following
 410 specific primers were used : GABARAP (F-GCCTTTCCCATCCTGCTGTA and R-
 411 GGAAGGGATTGCTGGTTCT), GABARAPL1 (F-CCCTCCCTTGGTTATCATCCA and R-
 412 ACTCCACCCCAAAAATCC), GABARAPL2 (F-TAGTGGCCACAATGACCAGA and R-
 413 TGAACACAGCTTTGGTCCAG), LC3B (F-CGGAAAGCAGCAGTGATACCA and R-
 414 GGCAGAAGGGAGTGTGTCTGA), SNAI1 (F- CGCGCTCTTCCTCGTCAG and R-
 415 TCCCAGATGAGCATTGGCAG), TWIST (F-CGGGAGTCCGAGTCTTA and R-TGAATCTTGCTCAGCTTGTC),
 416 ZEB1 (F- AGCAGTGAAAGAGAAGGGAATGC and R-GGTCCTCTTCAGGTGCCTCAG), E-cadherin (F-
 417 AGGATGGTGTAAGCGATGGC and R-CGGGAATGCAGTTGAGGATC), N-cadherin (F-
 418 CTCATATGGTGGAGCTGTGGC and R-TGTGGGAATCCGACGAATG) and SMAD2 (F-
 419 ACCGAAATGCCACGGTAGAA and R- TGGGGCTCTGCACAAAGAT), SMAD3 (F-
 420 GCCTGTGCTGGAACATCATC and R- TTGCCCTCATGTGTGCTCTT) and SMAD4 (F-
 421 CATCCTGCTCCTGAGTATTGG and R- GGGTCCACGTATCCATCAAC). H3B2 was used as housekeeping
 422 gene (F-GCTAGCTGGATGTCTTTTGG and R-GTGGTAAAGCACCCAGGAA).

423 ***Confocal microscopy***

424 A549 cells were plated on coverslips in 24-well plates at a density of 20 000 cells/well. For
 425 transient transfection, the ptf-LC3 (137624, Addgene) plasmid was transfected using the Jetprime
 426 reagent (114-07, Polyplus transfection) according to the manufacturer's protocol. The next day, the
 427 cells were washed with cold PBS and were fixed with 4 % PFA (paraformaldehyde) in PBS for 15 min
 428 at room temperature and mounted using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (F4680, Sigma

429 Aldrich). Images were acquired with a Zeiss LSM 800 AiryScan confocal microscope (63x objective).
430 Red and yellow puncta were counted using the “Green and Red puncta colocalization tool” designed
431 for Image J. For each experiment, 20 cells were randomly selected.

432 For phalloidin staining, cells were treated or not with TGF β /TNF α for 24 h. The cells were
433 washed with cold PBS, fixed using 4 % PFA in PBS for 15 min and stained with 10 μ M phalloidin for
434 10 min. The cells were wash 3 times and the nucleus were stained using DAPI (4', 6'-diamidino-2-
435 phénylindole) and mounted using Fluoromount Aqueous Mounting Medium. The cells were analyzed
436 using a Zeiss confocal microscope. For each experiment, 10 cells were randomly selected and the
437 area of the cells were measured using Image J software.

438 ***Statistical calculation***

439 Statistical analyses were carried out using Graphpad Prism statistical software. For all
440 experiment, results are reported as mean \pm S.E.M. Number of technical replicates for each
441 experiment and statistical test conducted for each analysis is indicated in the corresponding figure
442 legend. P-Values <0,05 were considered as threshold for significance.

443 ***Conflict of interest***

444 The authors declare no conflict of interest.

445

446 **Figure legends**

447 **Figure 1. GABARAPL1 correlates with EMT markers in lung adenocarcinomas**

448 **A.** Correlations between *ATG8* and *EMT-related* gene expression in primary lung adenocarcinoma.
449 Correlation circles were built with the two first components (Dim1 and Dim2) of the principal
450 component analysis (PCA). Dim1 and Dim2 explain 32.18% and 21.62 of variability respectively.
451 PCA was performed with the RNAseq data downloaded from the TCGA data portal (372 samples). **B.**
452 Immunohistochemical analysis of GABARAP and GABARAPL1 staining in lung adenocarcinoma

19

453 tumors (60 tumors) classified according to the high Vimentin staining (EMT+, 30 tumors) and low
454 Vimentin staining (EMT-, 30 tumors). Data are represented as \pm S.E.M. $P^* < 0,05$ compared to the EMT-
455 ; P-values were calculated using a Student's t test.

456

457 **Figure 2. *GABARAPL1* expression is increased during TGF β /TNF α -induced EMT**

458 **A.** Transcriptome analysis of *ATG8* gene expression. *ATG8* gene expression was quantified by
459 microarray in A549 and ACHN cells untreated or treated by TGF β (5 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) for
460 5 days (26). Data are represented as \pm S.E.M. of four independent experiments $P^* < 0,05$ compared to
461 the control ; P-values were calculated using a Student's t test. **B.** mRNA levels of *GABARAP*,
462 *GABARAPL1*, *GABARAPL2* and *LC3B* were measured by qRT-PCR during 0, 10 h, 18 h and 24 h of TGF β
463 (5 ng/ml)/TNF α (20 ng/ml)-induced EMT in A549 cells. The values calculated by DDCT method are
464 relative to the levels of H3B2 and expressed as fold of change. Data are represented as \pm S.E.M. of
465 three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using a
466 Student's t test.

467

468 **Figure 3. The *GABARAPL1* knock-out does not modify autophagy flux.**

469 **A.** Western blot analysis of *GABARAPL1* level in A549c, ACHNc and KO *GABARAPL1* cells untreated or
470 treated with 50 mM NH₄Cl for 2 h. **B.** Western blotting analysis of *LC3B* levels in A549c, ACHNc and
471 KO *GABARAPL1* cells cultured in complete medium and treated, or not, with 50 mM NH₄Cl for 2 h. β -
472 actin was used as a loading control. Protein levels were quantified using Image Lab. Data are
473 represented as \pm S.E.M. of at least four independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ;
474 P-values were calculated using a Wilcoxon test. **C.** GFP-RFP-LC3 puncta analysis in A549c, A549 KO
475 GL1 cells transfected with the ptf-LC3 vector and cultured in complete medium by confocal
476 microscopy. Each picture is representative of a typical staining observed in 20 fields chosen at

20

477 random. Red and yellow puncta were counted using the ImageJ software (Green and Red puncta
478 colocalization tool). In each group 20 cells were randomly selected. Data are represented as \pm S.E.M.
479 of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using
480 a Student's t test.

481

482 **Figure 4. The GABARAPL1 knock-out leads to an induction of EMT.**

483 **A.** Mesure of the area of A549c and A549 KO GABARAPL1 cells treated, or not, with TGFb (5 ng/ml)
484 and TNFa (20 ng/ml) during 24 h. The cells were stained using rhodamin phalloidin and the cell areas
485 were measured using a confocal microscope and the Image J software. Data are represented as
486 \pm S.E.M. of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were
487 calculated using a Student's t test. **B.** Western blotting analysis of N-Cadherin and E-Cadherin levels
488 in A549c and KO GABARAPL1 cells untreated or treated with TGFb (5 ng/ml) and TNFa (20 ng/ml)
489 during 24 h. b-actin was used as loading control. Protein levels were quantify using Image Lab. Data
490 are represented as \pm S.E.M. of at least four independent experiments $P^* < 0,05$ compared to the
491 control ; P-values were calculated by Student's t test. **C.** mRNA levels of *CDH1* and *CDH2* were
492 measured by qRT-PCR in A549c and A549 KO GABARAPL1 cells and in ACHNc and ACHN KO GABARAPL1
493 cells untreated or treated with TGFb 5 ng/ml and TNFa 20 ng/ml for 24 h. The values calculated by
494 the DDCT method are relative to H3B2 levels and expressed as a fold of change. Data are represented
495 as \pm S.E.M. of at least three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values
496 were calculated using a Student's t test.

497

498 **Figure 5. GABARAPL1 knock-out leads to an increase of SNAI1 levels.**

499 **A.** Western blotting analysis of SNAI1 levels in untreated A549c and KO GABARAPL1 cells. **B.** Western
500 blotting analysis of SNAI1 levels in A549c and KO GABARAPL1 cells untreated or treated with 50 mM

21

501 NH₄Cl for 2h. b-actin was used as a loading control. Protein levels were quantified using Image Lab.
502 Data are represented as \pm S.E.M. of at least five independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the
503 control ; P-values were calculated using a Student's t test. **C.** mRNA levels of *SNAI1* were measured by
504 qRT-PCR in A549c, ACHNc and KO GABARAPL1 untreated cells. The value calculated by the DDCT
505 method are relative to H3B2 levels and expressed as fold of change. Data are represented as \pm S.E.M.
506 of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using
507 a Student's t test.

508

509 **Figure 6. GABARAPL1 knock-out leads to an increase of SMAD protein levels by inhibiting their**
510 **autophagy degradation**

511 **A.** Western blotting analysis of SMAD2, SMAD3 and SMAD4 level in untreated A549c and KO
512 GABARAPL1 cells. **B.** mRNA levels of *SMAD2*, *SMAD3* and *SMAD4* were measured by qRT-PCR in
513 untreated A549c and KO GABARAPL1 cells. The values calculated by the DDCT method are relative to
514 H3B2 levels and expressed as fold of change. Data are represented as \pm S.E.M. of at least three
515 independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using a
516 Student's t test. **C.** Western blotting analysis of SMAD2, SMAD3 in A549c, KO GABARAPL1 and SMAD4
517 in ACHNc and KO GABARAPL1 cells untreated or treated with 50mM NH₄Cl for 2h. b-actin was used
518 as a loading control. Protein levels were quantified using Image Lab. Data are represented as \pm S.E.M.
519 of at least four independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were
520 calculated using a Student's t test.

521

522 **Figure 7. GABARAPL1 knock out increase cell proliferation and invasion**

523 **A.** Growth rate of A549c and KO GABARAPL1 cells using MTT assay. The data representative of three
524 independent experiments performed in 8 replicates are shown. **B.** Invasion of A549c, KO GL1 c1 and

22

525 KO GL1 c3 in Boyden-modify chamber. Cell density was estimated with photographs using EvosXL
526 Core microscope. Data are represented as \pm S.E.M. of three independent experiments. $P^* < 0,05$
527 compared to the control ; P-values were calculated using a Student's t test.

528

529 **Figure S1. Transcriptome analysis of TGF β /TNF α -induced EMT in MCF10A cells**

530 **A.** Transcriptome analysis of *ATG8* gene expression. *ATG8* gene expression was quantified by
531 microarray in MCF10A cells untreated or treated with TGF β (5 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) for 5 days
532 (26). Data are represented as \pm S.E.M. of four independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the
533 control ; P-values were calculated using a Student's t test.

534

535 **Figure S2. A549 and ACHN KO GABARAPL1 cell models.**

536 **A.** Western blot analysis of GABARAP and GABARAPL2 levels in A549c, ACHNc and KO GABARAPL1
537 cells untreated or treated with 50 mM NH $_4$ Cl for 2 h. b-actin was used as a loading control. Protein
538 levels were quantified using Image Lab. Data are represented as \pm S.E.M. of at least three independent
539 experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using a Student's t test. **B.**
540 mRNA levels of *GABARAP*, *GABARAPL1*, *GABARAPL2* and *LC3B* were measured by qRT-PCR in A549c,
541 ACHNc and KO GABARAPL1 cells. The values calculated by the DDCT method are relative to H3B2
542 levels and expressed as fold of change. Data are represented as \pm S.E.M. of three independent
543 experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using a Student's t test.

544

545 **Figure S3. GABARAPL1 knock-out does not modify TWIST protein levels.**

546 **A.** mRNA levels of *SNAI1*, *TWIST* and *ZEB1* were measured by qRT-PCR in A549c cells untreated or
547 treated with TGF β (5 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) from 10 to 24 h. The value calculated by the DDCT
548 method are relative to H3B2 levels and expressed as fold of change. Data are represented as \pm S.E.M.

23

549 of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using
550 a Student's t test. **B.** Western blotting analysis of TWIST level in A549c and KO GABARAPL1 untreated
551 cells. b-actin was used as a loading control. Protein levels were quantified using Image Lab. Data are
552 represented as \pm S.E.M. of ten independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values
553 were calculated using a Student's t test. **C.** *SNAI1* mRNA stability was studied by qRT-PCR in A549c
554 and KO GABARAPL1 cells during actinomycin D (2,5 μ g/ml) treatment for 0; 0,5; 0,75; 1; 2 and 4 h.
555 The value calculated by the DDCT method are relative to H3B2 levels and expressed as fold of change.
556 Data are represented as \pm S.E.M. of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control
557 ; P-values were calculated using a Student's t test. **D.** mRNA levels of *SNAI1* were measured by qRT-
558 PCR in A549c, ACHNc and KO GABARAPL1 cells untreated or treated with TGF β (5 ng/ml) and TNF α
559 (20 ng/ml) during 24 h. The value calculated by the DDCT method are relative to H3B2 levels and
560 expressed as fold of change. Data are represented as \pm S.E.M. of three independent experiments.
561 $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were calculated using a Student's t test. **E.** Western
562 blotting analysis of *SNAI1* level in A459c and KO GABARAPL1 cells untreated or treated with TGF β (5
563 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) during 24 h. Protein levels were quantified using Image Lab. Data are
564 represented as \pm S.E.M. of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-
565 values were calculated using a Student's t test.

566

567 **Figure S4. SMAD2 and SMAD3 protein levels are not modified in ACHN KO GABARAPL1 cells.**

568 Western blotting analysis of SMAD2 and SMAD3 in ACHNc and ACHN KO GABARAPL1 cells. b-actin
569 was used as a loading control. Protein levels were quantified using Image Lab. Data are represented
570 as \pm S.E.M. of three independent experiments. $P^* < 0,05$ compared to the control ; P-values were
571 calculated using a Student's t test.

572

- 573 1. Yousefi M, Bahrami T, Salmaninejad A, Nosrati R, Ghaffari P, Ghaffari SH. Lung cancer-associated
574 brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cell Oncol.* 2017 Oct
575 1;40(5):419–41.
- 576 2. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.*
577 2017 Feb 9;168(4):670–91.
- 578 3. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018
579 Feb;18(2):128–34.
- 580 4. Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell.* 2008 Jul 25;134(2):215–30.
- 581 5. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016 Jun 30;166(1):21–45.
- 582 6. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol CB.*
583 2012 Jan 10;22(1):R29-34.
- 584 7. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation.
585 *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):124–31.
- 586 8. Ashford TP, Porter KR. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biol.*
587 1962 Jan 1;12(1):198–202.
- 588 9. Fortun J, Dunn WA, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging Role for Autophagy in the Removal of
589 Aggresomes in Schwann Cells. *J Neurosci.* 2003 Nov 19;23(33):10672–80.
- 590 10. Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy.
591 *Int J Cell Biol.* 2012;2012:736905.
- 592 11. He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, et al. Post-translational Modifications of Three Members
593 of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *J*
594 *Biol Chem.* 2003 Jan 8;278(31):29278–87.
- 595 12. Legesse-Miller A, Sagiv Y, Porat A, Elazar Z. Isolation and Characterization of a Novel Low
596 Molecular Weight Protein Involved in Intra-Golgi Traffic. *J Biol Chem.* 1998 Jan 30;273(5):3105–
597 9.
- 598 13. Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding
599 subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem.* 1994 Apr 15;269(15):11492–7.
- 600 14. Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick J-L, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein
601 related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res*
602 *Commun.* 2004 Dec 10;325(2):639–48.
- 603 15. Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL. Identification and
604 characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells.
605 *Mol Cell Endocrinol.* 1993 Jan;90(2):R17-21.
- 606 16. Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator,
607 interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J.* 2000 Apr 3;19(7):1494–504.

- 608 17. Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA(A)-receptor-associated protein links
609 GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature*. 1999 Jan 7;397(6714):69–72.
- 610 18. Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, et al. Cloning, Expression Patterns, and Chromosome
611 Localization of Three Human and Two Mouse Homologues of GABAA Receptor-Associated
612 Protein. *Genomics*. 2001 Jun 15;74(3):408–13.
- 613 19. Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, et al. ATG8 Family Proteins
614 Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex: SEQUENCE REQUIREMENTS FOR LC3-
615 INTERACTING REGION (LIR) MOTIFS. *J Biol Chem*. 2012 Nov 16;287(47):39275–90.
- 616 20. Rogov VV, Stolz A, Ravichandran AC, Rios-Szwed DO, Suzuki H, Kniss A, et al. Structural and
617 functional analysis of the GABARAP interaction motif (GIM). *EMBO Rep*. 2017;18(8):1382–96.
- 618 21. Jacquet M, Guittaut M, Fraichard A, Despouy G. The function of ATG8 proteins in autophagy and
619 cancer: linked or unrelated? *Autophagy En Révis*. 2020;
- 620 22. Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, Bremer E, Wiersma VR. The multifaceted role of autophagy
621 in cancer and the microenvironment. *Med Res Rev*. 2018 Oct 9;
- 622 23. Catalano M, D’Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, et al. Autophagy
623 induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol*.
624 2015 Oct;9(8):1612–25.
- 625 24. Grassi G, Di Caprio G, Santangelo L, Fimia GM, Cozzolino AM, Komatsu M, et al. Autophagy
626 regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial
627 transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis*. 2015 Sep 10;6(9):e1880.
- 628 25. Lv Q, Wang W, Xue J, Hua F, Mu R, Lin H, et al. DEDD Interacts with PI3KC3 to Activate Autophagy
629 and Attenuate Epithelial–Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer. *Cancer Res*. 2012
630 Jul 1;72(13):3238–50.
- 631 26. Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, Missey A, Lachat C, Perrard J, et al. EMT is associated with an
632 epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Feb 27 [cited
633 2019 Nov 26];10(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6393505/>
- 634 27. Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human Light Chain 3/MAP1LC3B Is Cleaved at Its Carboxyl-
635 terminal Met121 to Expose Gly120 for Lipidation and Targeting to Autophagosomal
636 Membranes. *J Biol Chem*. 2004 Dec 11;279(46):47704–10.
- 637 28. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel
638 reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*. 2007 Oct;3(5):452–60.
- 639 29. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly
640 to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol*
641 *Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24131–45.
- 642 30. Ahmadi A, Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Transforming growth factor- β signaling:
643 Tumorigenesis and targeting for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2018 Dec 7;

- 644 31. Jacomin A-C, Samavedam S, Promponas V, Nezis IP. iLIR database: A web resource for LIR motif-
645 containing proteins in eukaryotes. *Autophagy*. 2016 02;12(10):1945–53.
- 646 32. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of
647 gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast
648 cancer. *Br J Cancer*. 2010 Mar 16;102(6):1024–31.
- 649 33. Zhang Y, Wang F, Han L, Wu Y, Li S, Yang X, et al. GABARAPL1 negatively regulates Wnt/ β -catenin
650 signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell Physiol Biochem*
651 *Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2011;27(5):503–12.
- 652 34. Liu C, Xia Y, Jiang W, Liu Y, Yu L. Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome
653 for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2014 May;31(5):2043–8.
- 654 35. Tong H, Yin H, Hossain MA, Wang Y, Wu F, Dong X, et al. Starvation-induced autophagy
655 promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells via TGF- β 1/Smad3-
656 mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J Cell Biochem*. 2018 Oct 15;
- 657 36. Zou M, Zhu W, Wang L, Shi L, Gao R, Ou Y, et al. AEG-1/MTDH-activated autophagy enhances
658 human malignant glioma susceptibility to TGF- β 1-triggered epithelial-mesenchymal transition.
659 *Oncotarget*. 2016 Feb 20;7(11):13122–38.
- 660 37. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the
661 human cancer transcriptome. *Science*. 2017 18;357(6352).
- 662 38. Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, et al. GABAergic system gene
663 expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc*
664 *Clin Oncol*. 2004 Oct 15;22(20):4127–34.
- 665 39. Brigger D, Torbett BE, Chen J, Fey MF, Tschan MP. Inhibition of GATE-16 attenuates ATRA-
666 induced neutrophil differentiation of APL cells and interferes with autophagosome formation.
667 *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Aug 23;438(2):283–8.
- 668 40. Hervouet E, Claude-Taupin A, Gauthier T, Perez V, Fraichard A, Adami P, et al. The autophagy
669 GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer*. 2015 Oct
670 17;15:729.
- 671 41. Ding Y, Kim S I., Lee S-Y, Koo JK, Wang Z, Choi ME. Autophagy Regulates TGF- Expression and
672 Suppresses Kidney Fibrosis Induced by Unilateral Ureteral Obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2014
673 Dec 1;25(12):2835–46.
- 674 42. Zada S, Hwang JS, Ahmed M, Lai TH, Pham TM, Kim DR. Control of the Epithelial-to-
675 Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis by Autophagy-Dependent SNAI1 Degradation.
676 *Cells*. 2019 Feb 6;8(2).
- 677 43. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009
678 Feb;19(2):156–72.

- 679 44. Poillet-Perez L, Jacquet M, Hervouet E, Gauthier T, Fraichard A, Borg C, et al. GABARAPL1 tumor
680 suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast
681 cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Aug 22;8(34):55998–6020.
- 682 45. Rho SB, Byun H-J, Kim B-R, Kim IS, Lee JH, Yoo R, et al. GABAA receptor-binding protein promotes
683 sensitivity to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Int J Oncol*. 2013 May;42(5):1807–
684 14.
- 685 46. Park SH, Kim B-R, Lee JH, Park ST, Lee S-H, Dong SM, et al. GABARBP down-regulates HIF-1 α
686 expression through the VEGFR-2 and PI3K/mTOR/4E-BP1 pathways. *Cell Signal*. 2014
687 Jul;26(7):1506–13.
- 688 47. Islam MdA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int*
689 *J Mol Sci* [Internet]. 2018 May 8 [cited 2019 Jan 22];19(5). Available from:
690 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983640/>
- 691 48. Birgisdottir ÁB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*.
692 2013 Aug 1;126(Pt 15):3237–47.
- 693 49. Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, Morishita Y, Komuro A, Kano MR, et al. Autophagy Is
694 Activated by TGF- and Potentiates TGF- -Mediated Growth Inhibition in Human Hepatocellular
695 Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 2009 Dec 1;69(23):8844–52.
- 696 50. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong S, et al. EMT is not required for lung metastasis
697 but contributes to chemoresistance. *Nature*. 2015 Nov 26;527(7579):472–6.
- 698 51. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. EMT Program is Dispensable
699 for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Nature*. 2015 Nov
700 26;527(7579):525–30.
- 701 52. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer*
702 *Metastasis Rev*. 2016;35(4):645–54.
- 703 53. Herfs M, Longuespée R, Quick CM, Roncarati P, Suarez-Carmona M, Hubert P, et al. Proteomic
704 signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *J*
705 *Pathol*. 2017;241(4):522–33.
- 706 54. Hubert P, Herman L, Roncarati P, Maillard C, Renoux V, Demoulin S, et al. Altered α -defensin 5
707 expression in cervical squamocolumnar junction: implication in the formation of a viral/tumour-
708 permissive microenvironment. *J Pathol*. 2014 Dec;234(4):464–77.
- 709

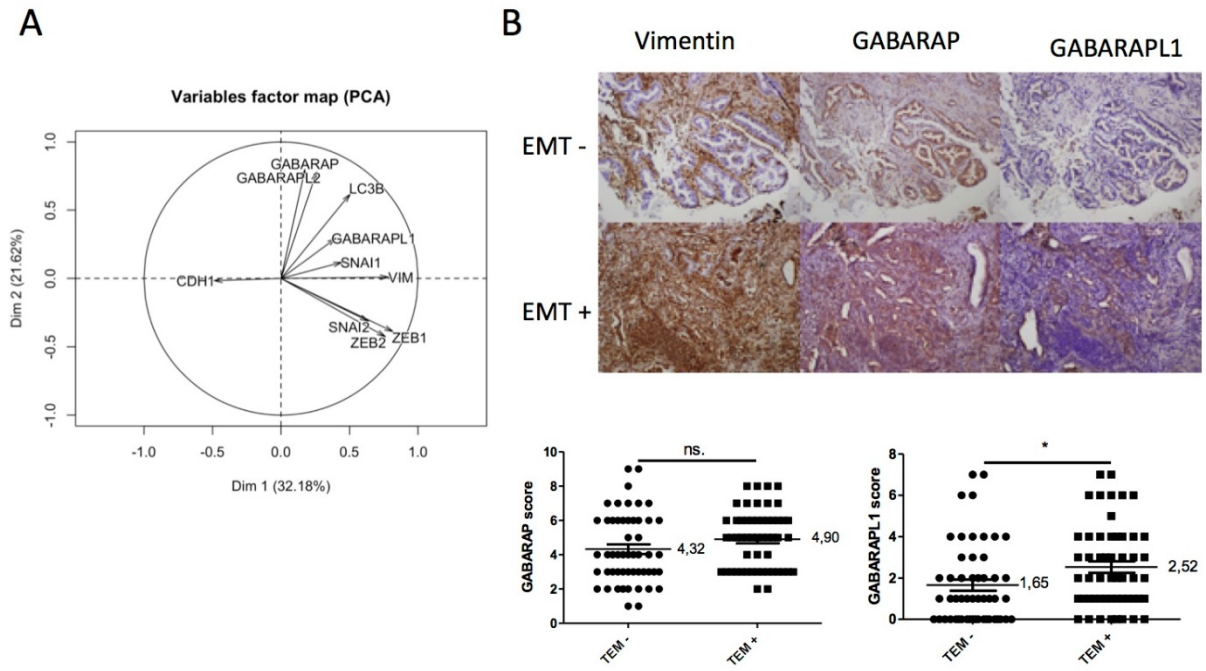


Figure 1.

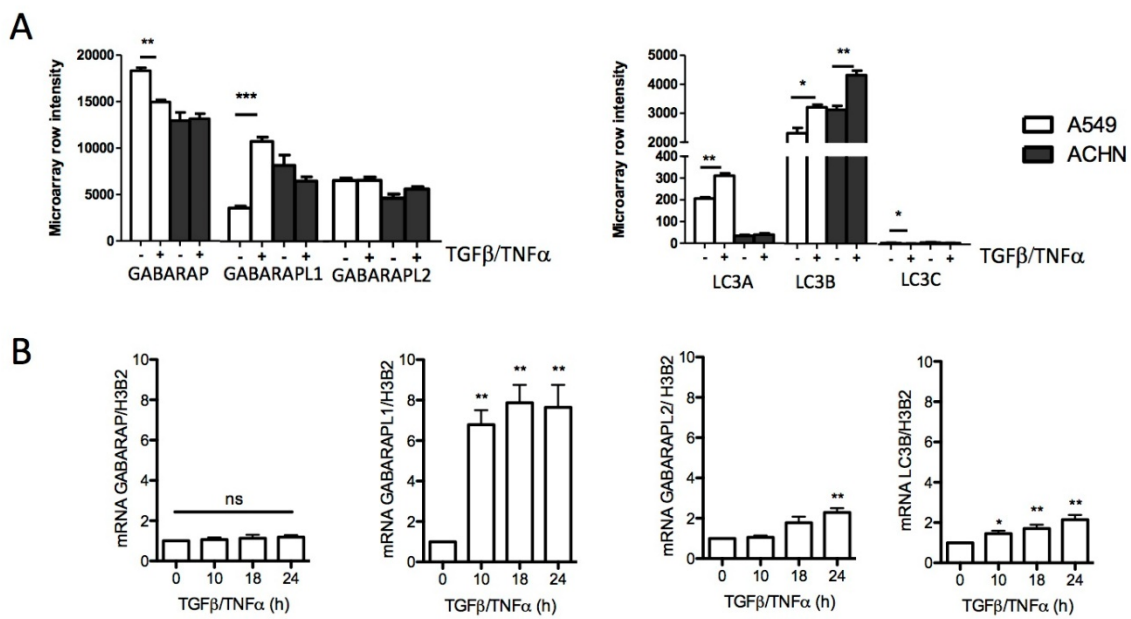


Figure 2.

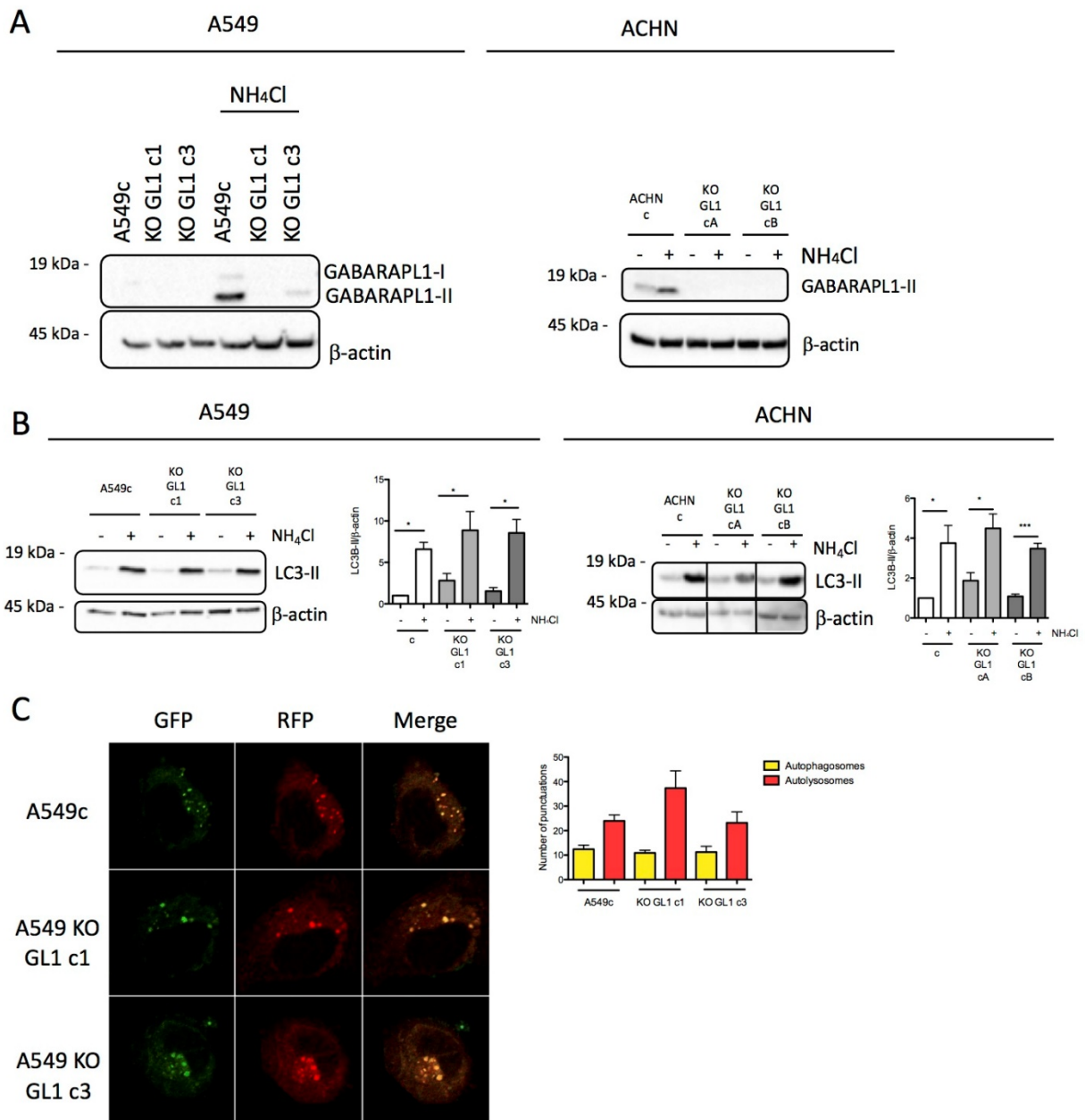


Figure 3.

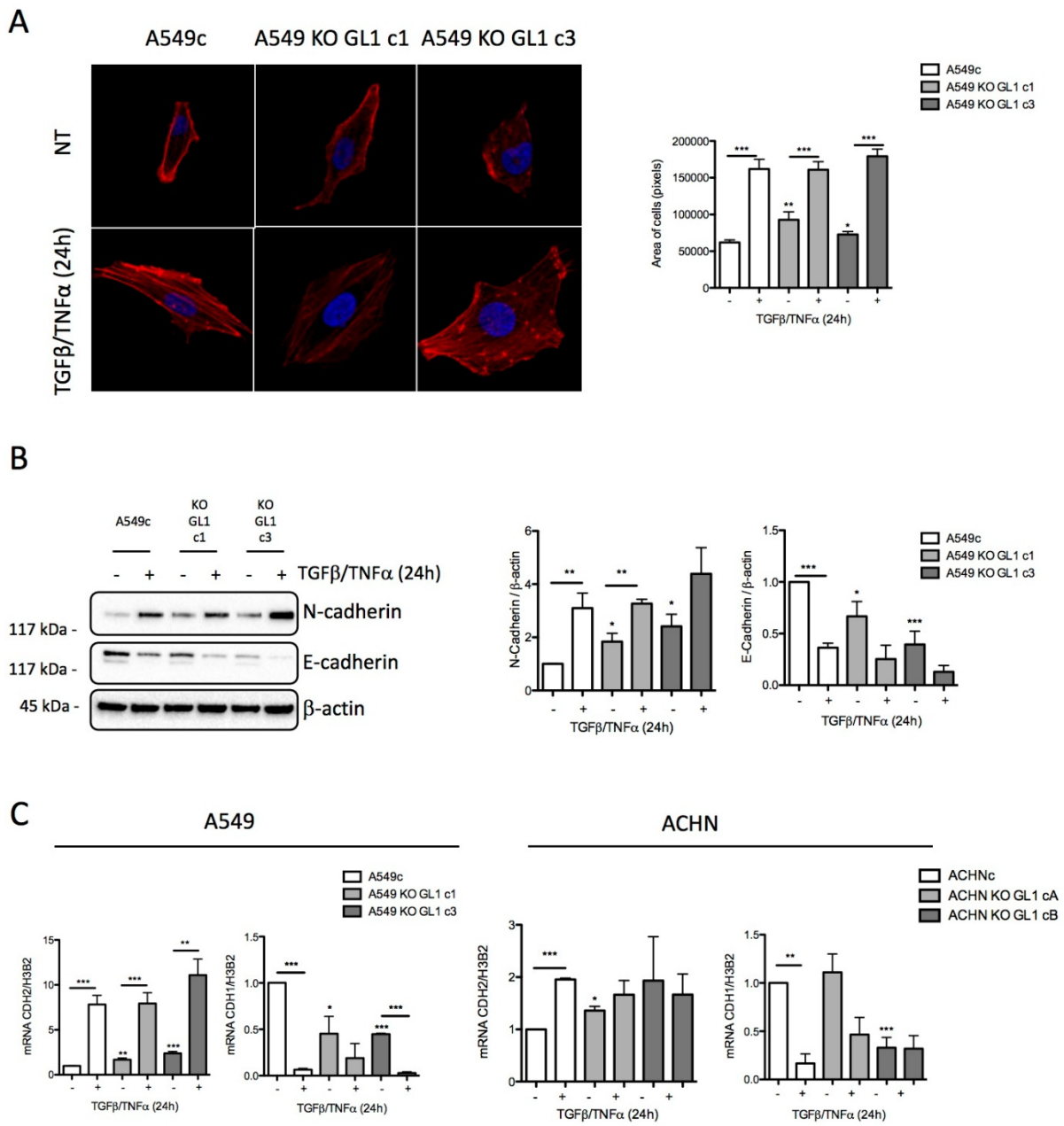


Figure 4.

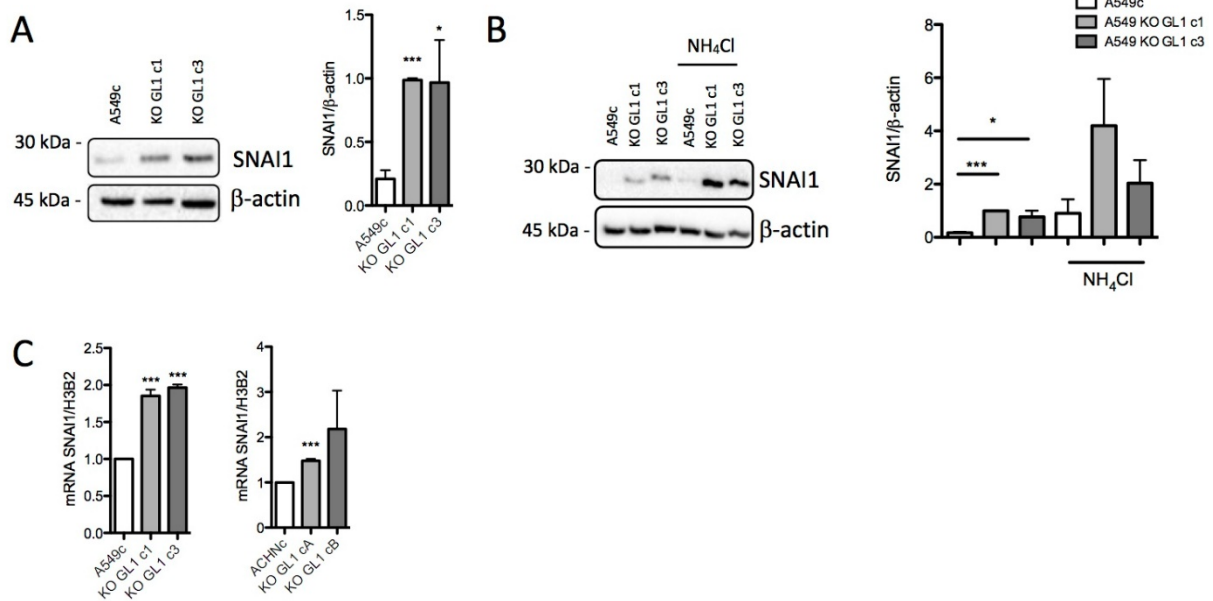


Figure 5.

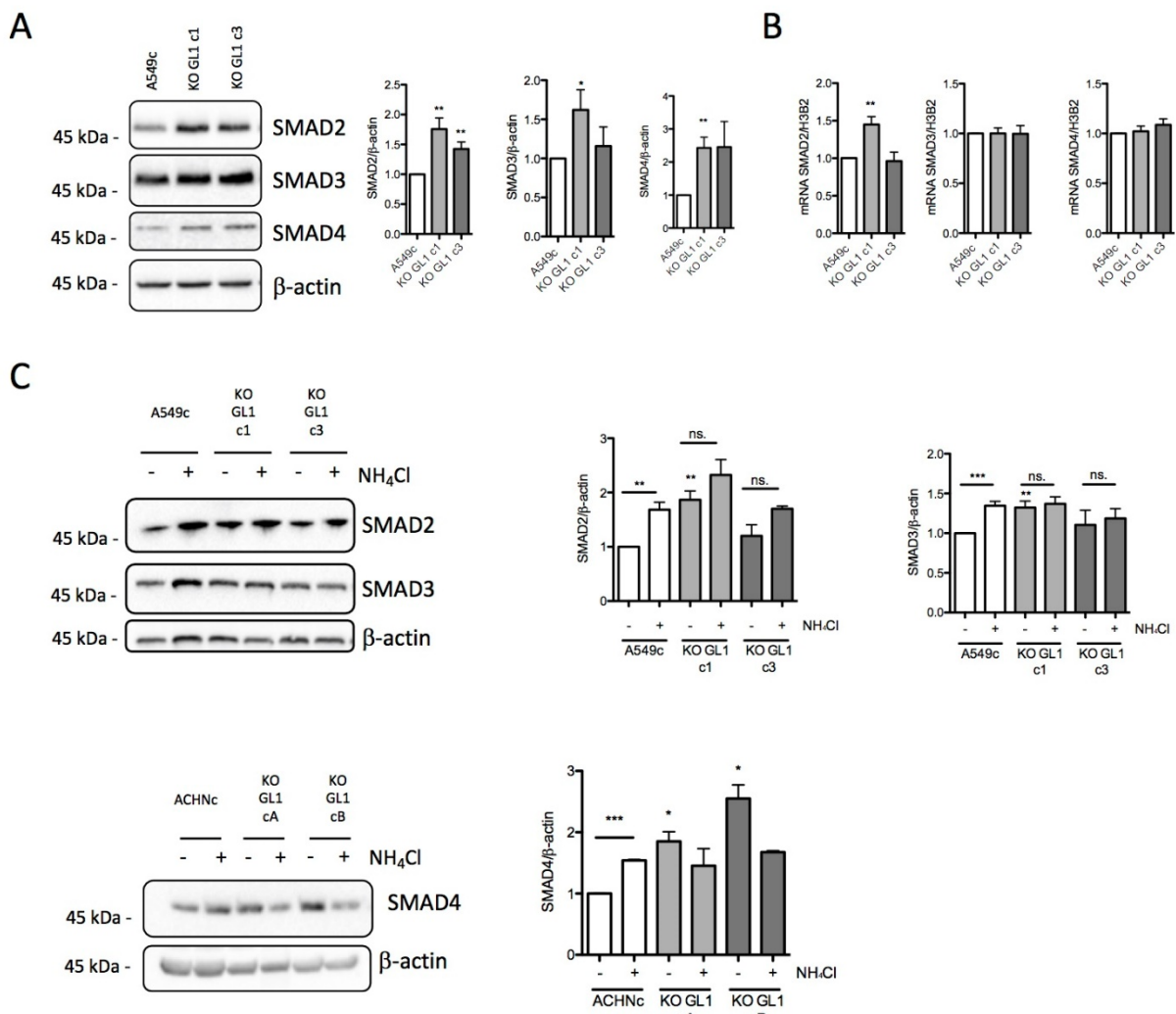


Figure 6.

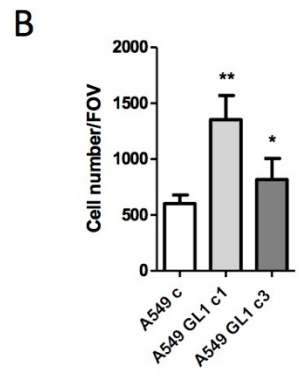
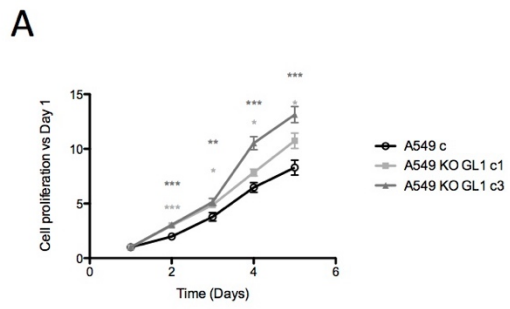


Figure 7.

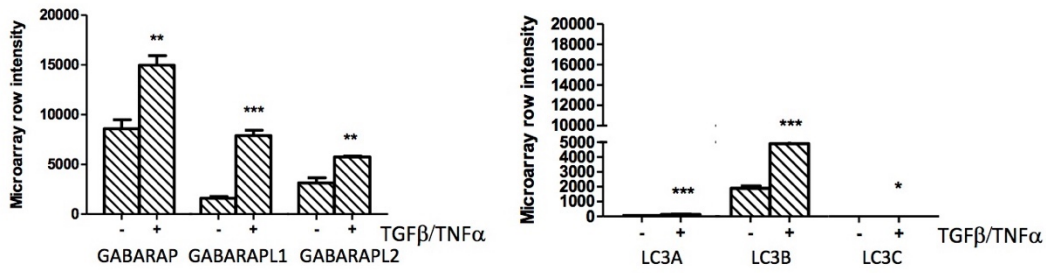


Figure S1

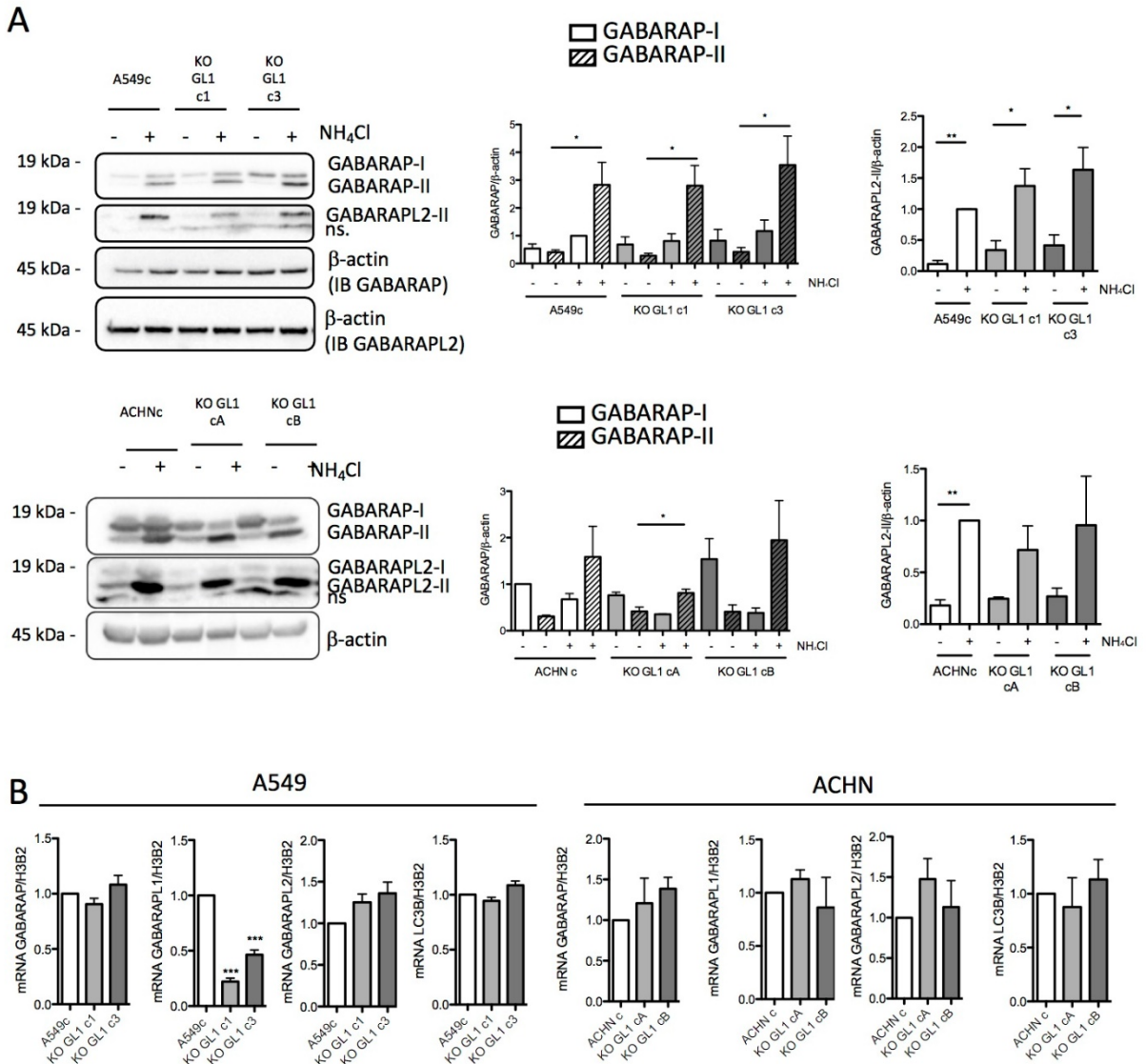


Figure S2.

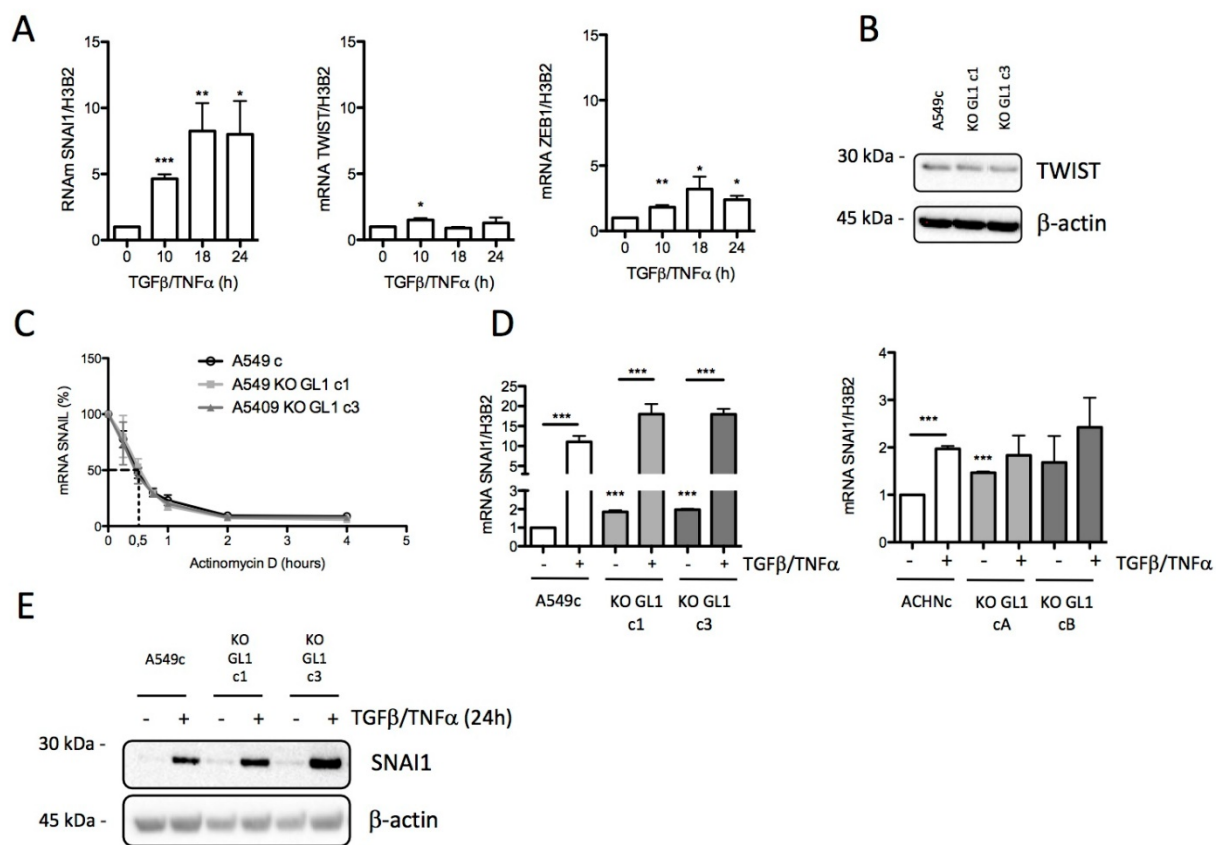


Figure S3.

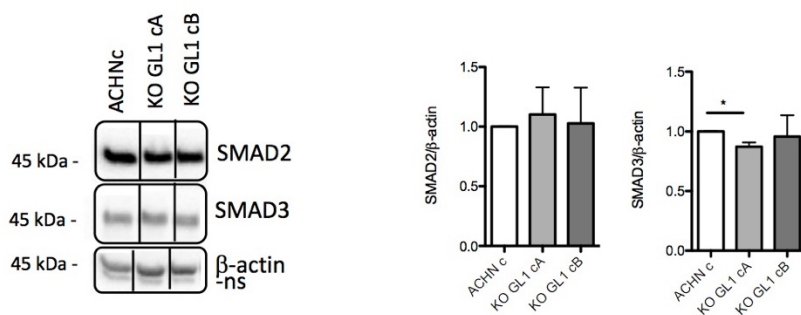


Figure S4.

Revue I :

The function of ATG8 proteins in autophagy and cancer: linked or unrelated?

Marine Jacquet, Michaël Guittaut, Annick fraichard and Gilles Despouy

En révision dans le journal *Autophagy*

The functions of ATG8 proteins in autophagy and cancer: linked or unrelated?

Marine Jacquet^a, Michaël Guittaut^{a,b}, Annick Fraichard^a and Gilles Despouy^{a*}

a Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France.

b DImaCell platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.

* Corresponding author:

Dr. Gilles Despouy, Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France.

Email: gilles.despouy@univ-fcomte.fr

Abbreviations:

AIM: ATG8 interacting motif

AMPK: Adenosine monophosphate associated protein kinase

ATG: Autophagy-related

BECN1: Beclin1

BRUCE: BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme

GABA_A: Gamma-aminobutyric acid receptors type A

GABARAP: GABA type A receptor-associated protein

GABARAPL1: GABARAP-like 1

GABARAPL2: GABARAP-like 2

LAP: LC3-associated phagocytosis

LC3: Light chain 3

MTOR: Mammalian target of rapamycin

NIX: Nip-like protein X

PI3KC3-C1: Class III phosphatidylinositol 3-kinase complex 1

PI4KII α : Phosphatidylinositol 4-kinase II α

PLEKHM1: Pleckstrin homology domain containing protein family member 1

SQSTM1: Sequestrosome 1

ULK1: Unc51-like kinase 1

The functions of ATG8 proteins in autophagy and cancer: linked or unrelated?

The ATG8 family is subdivided in two subfamilies: the GABARAP and LC3 subfamilies. These proteins, which are major players of the autophagy pathway, present a conserved glycine in their C-terminus which is necessary for their association to the autophagosome membrane. This family of proteins presents multiple roles from autophagy induction to autophagosome-lysosome fusion and have been described to play a role during cancer progression. Indeed, GABARAPs have been described to be down-regulated in cancers and their high expression has been linked to a good prognosis. Regarding LC3s, their expression does not correlate to a particular tumor type or stage. The involvement of ATG8 members during cancer is therefore remains unclear and it appears that their anti-tumor role maybe associated to their implication in selective protein degradation by autophagy but may also be independent, in some cases, of their conjugation to autophagosomes.

In this review, we will then focus on the involvement of GABARAP and LC3 subfamilies during autophagy and cancer and highlight the similarities but also the differences of action of each subfamily member.

Introduction

Autophagy is a multistep degradation process initiated by the formation of a double membrane vesicle called autophagosome which sequestered cytoplasmic component, soluble protein, protein aggregates or even organelles (Figure 1). Then, the autophagosome fuse with a lysosome to form an autolysosome and the content is degraded through the lysosomal hydrolases [1]. Basal autophagy is essential to maintain cellular homeostasis and occurs in every cells but this process can also be specifically induced by some cell stresses, such as amino acid starvation or hypoxia, in order to maintain cellular energy levels [2]. Even if autophagy was firstly described as a random degradation process, different types of selective autophagy have since been discovered have been discovered since [3–5]. Deregulation of autophagy is involved in various pathologies such as cancer in which autophagy presents a paradoxal role depending on tumor stage or tumor type. Indeed, it can act as a tumor suppressor mechanism, mainly during the early steps of tumorigenesis by limiting oncogenic stresses such as DNA damage or oxidative stress, but it can also act as a tumor promotor pathway, during the late stages of tumor progression by allowing cancer cell survival under nutrient starvation condition or hypoxia, conditions usually detected in the tumor microenvironment [6]. Therefore,

understanding the role and regulation of autophagy proteins is important for the comprehension of cancer progression and, in the future, develop new anti-cancer therapies targeting the autophagy process in cancers.

The autophagy pathway requires more than 50 different proteins called ATGs (Autophagy-related), and some of these are the ATG8 (Autophagy-related 8) proteins. ATG8 proteins have all been described to be implicated in many mechanisms such as cellular trafficking, autophagy and cancer. This family comprises two subfamilies: the GABARAP (GABA type A receptor-associated protein) subfamily composed of 3 members, GABARAP, GABARAPL1 (GABARAP-like 1), and GABARAPL2 (GABARAP-like 2), and the MAP-LC3 (Microtubule-associated protein light chain 3) subfamily, hereafter referred as LC3, composed of 5 members, LC3A with two alternatively spliced isoforms (LC3A α and LC3A β) which differs in their N-terminus, LC3B and LC3B2 with only one different amino-acid from LC3B and LC3C [7–14]. To date, studies on LC3A did not discriminate the two existing splicing variants. Moreover, only few studies on LC3B2 exist and it will not be addressed here. ATG8 proteins share a high homology at the mRNA, protein and structural level [15]. Indeed, they are all composed of two α helices in their N-terminus, a β -strand in their C-terminus and a core structure which is similar to the one described in the Ubiquitin protein [16,17].

If the role of GABARAPs and LC3s during autophagy were first proposed to be redundant and compensatory, recent studies have highlighted the specificity of each subfamily, and even each subfamily member, in this process. These new data might explain their different behaviors during autophagy and cancer progression.

Roles of ATG8 proteins during the autophagy process

GABARAP, GABARAPL1, and GABARAPL2 genes are localized on chromosomes 17, 12 and 16, respectively [14] and are coding for three different proteins of 117 amino acids, GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2. Initially, the GABARAPs have been discovered as implicated in intracellular trafficking. Indeed, GABARAP and GABARAPL1 are involved in the transport of GABA_A receptor [10], N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF)[18] and κ -opioid receptor [19] and GABARAPL2 is involved in intra-Golgi trafficking [12]. Later, the GABARAPs have been identified to be involved in autophagy and associated to autophagosomes [20,21].

LC3A, LC3B, LC3B2 and LC3C genes are localized on chromosomes 20, 16, 12 and 1, respectively. These four genes lead to the expression of LC3A, LC3B, LC3B2 and LC3C proteins containing 121, 125, 125 and 147 amino acids, respectively. The LC3s, like the

GABARAPs, are involved in the autophagy process [22] and intracellular trafficking. For example, LC3s regulate a specific phagocytosis process called LC3-associated phagocytosis (LAP), which induces transmembrane receptor uptake, e.g. TLR (Toll Like Receptors), TRIM4 (Tripartite motif containing 4) or Dectin-1, from the plasma membrane to the lysosome to induce their degradation [23]. The LAP mechanism has been described to be implicated in antigen presentation on major histocompatibility complex (MHC) and therefore lead to the immune system activation [24]. The LAP has been only described for LC3s and no study, to our knowledge, implicated the involvement of GABARAPs in this process. However, a similar mechanism has been described for the intracellular uptake of the Fn14 membrane receptor and its degradation through autophagy via the involvement of GABARAPL2 [25].

The implication of ATG8 proteins during autophagy is linked to a conserved glycine in their C-terminus, localized at the position 116 for the GABARAPs proteins, at the position 120 for LC3A and LC3B, and at the position 136 for LC3C. This glycine is essential for the association of ATG8 proteins to the autophagosome membrane (Figure 1). ATG8 proteins are first cleaved by ATG4 (Autophagy-related 4) proteases (ATG4A or ATG4B for GABARAP, GABARAPL2 and LC3B, ATG4B, ATG4C or ATG4D for GABARAPL1)[21,26–29] to give their mature cytosolic forms called ATG8-I. Next, ATG8-I are conjugated to a phosphatidylethanolamine/serine to give the autophagosome membrane-bound forms, called ATG8-II [17,21,30,31]. ATG8-II modified proteins act as markers of autophagosome formation and number in cells and LC3B-II proteins are widely used to characterize and quantify the autophagy flux [21]. This conjugation mechanism is reversible for the ATG8 proteins bound onto the external side of the autophagosome membrane, which can be released in the cytosol following the action of the ATG4 proteases [27], while the ones associated to the internal face of the autophagosome will be degraded with its content [32]. The study of ATG8 proteins has been initiated in yeast because it expresses only one ATG8 and it has been shown that ATG8 is essential for autophagosome formation [27]. Later, using the homology between yeast and human orthologues, ATG8 proteins have been studied in other organisms as human. Indeed, GABARAPs and LC3s have been both described to be involved in autophagosome assembly [33], elongation [34], membrane curvature [35], autophagosome closure, fusion between autophagosome and lysosome [31] and for selective autophagy [36,37]. Even if the role of ATG8 during autophagy appeared to be mainly linked to their presence at the autophagosome membrane but the ATG8 cytosolic forms may also present a role in autophagy. Cellular models expressing the GABARAPs-G116A or the LC3B-G120A mutant, in which the C-terminus glycine 116 or glycine 120 has been replaced by an alanine to inhibit their conjugation to the

membrane of the autophagosome, have been designed to highlight the role of the cytosolic and membrane-bound ATG8 [21,38–41].

The first evidence suggesting the implication of ATG8 proteins in autophagy pathway came from the establishment of the knockout of the LC3s, the GABARAPs or all ATG8 proteins in cellular models [42]. During basal autophagy, it appeared that GABARAPs proteins may be more important and essential than the LC3s. In basal autophagy, each GABARAPs contribute to basal autophagy [43] and the overexpression of only one member GABARAP1 is sufficient to increase basal autophagy flux independently of its conjugation to autophagosome [41]. During induced autophagy, the GABARAPs are also preponderant [44] but it appeared that the expression of only one ATG8 member is sufficient to ensure induced autophagy flux except LC3C [42]. Interestingly, unlike the observation made in basal autophagy, overexpression of GABARAP1 increased induced autophagy but this effect was dependent of its lipidation [41].

Altogether, these results suggest a main implication of GABARAPs in induced autophagy but the implication of both LC3s and GABARAPs in basal autophagy. These observations may be explained by the potential functional compensatory roles of ATG8 proteins and by their different roles during each autophagy steps.

Role of ATG8 proteins during the initiation of autophagy

The ATG8 proteins have been initially described to be involved in late stages of autophagy such as the closure of the phagophore and its fusion with the lysosomes. However, it has been recently shown that they might play a substantial role in the initiation of autophagy as well. The initiation of autophagy consists in the formation of a nascent double membrane structure, called phagophore, which then elongates to form a sealed autophagosome (Figure 1). During this step, major molecular complexes need to be recruited to the nascent phagophore. We can cite the ULK1 complex, composed of ULK1 (ATG1, Autophagy-related 1 or Unc51-like kinase 1), FIP200 (Focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa), ATG13 (Autophagy related 13) and ATG101 (Autophagy-related 101)[45]. This complex later recruits the PI3KC3-C1 complex, composed of BECN1 (Beclin 1), ATG14 (Autophagy related 14), PI3KC3 (Class III phosphatidylinositol 3-kinase) and VPS34 (Vacuolar protein sorting 34), leading to efficient autophagosome formation and maturation [46,47].

Firstly, it has been shown that GABARAPs and LC3s can interact with the ULK1 complex, *via* their interaction with ULK1, ATG13 and FIP200, to lead to the recruitment of this complex to the phagophore, but these interactions appeared to be weak with the LC3s.

Moreover, if the LC3 have been described to negatively regulate ULK1 [48], the GABARAPs seems to be essential for ULK1 activation. The GABARAPs role on ULK1 activation appeared to be multiple. First, it has been suggested that GABARAP and GABARAPL1 might activate ULK1 in the cytoplasm at the centriole and then the complex is relocalized to the growing phagophore [41,49,50]. Then, GABARAPL1 can also activate ULK1 by reducing MTOR activation leading to a decrease of the inhibitory MTOR-mediated phosphorylation of ULK1. Finally, GABARAPL1 might also increase AMPK-induced phosphorylation of ULK1 [41]. The interaction between ATG8 and ULK1 may also prevent excessive autophagy, as it has been described in yeast, adjusting the autophagy flux to physiological needs [51].

The PI3KC3-C1 complex is recruited to the phagophore through the interaction between GABARAP or GABARAPL1 with ATG14 [53] leading to the ULK1-mediated phosphorylation of ATG14, activation of this complex [52] and therefore the autophagy.

We may then hypothesize that GABARAP and GABARAPL1 first recruit and activate the ULK1 complex to the phagophore and then recruit the PI3KC3-C1 through their interaction with ATG14 inducing the localization of the latter in proximity of the ULK1 complex therefore leading to efficient ATG14 phosphorylation by ULK1 and then PI3KC3-C1 activation.

Role of ATG8 proteins during the elongation of the phagophore, membrane curvature and closure

ATG8 have also been described to be involved in autophagosome membrane elongation, membrane curvature and autophagosome closure and therefore in the regulation of the size of autophagosome (Figure 1). Indeed, low levels of ATG8 leads to a reduction in autophagosome size without affecting autophagosome number in yeast [54] but the implication of the ATG8 in the membrane curvature and elongation of autophagosomes is still not fully understood. *In vitro* studies have shown that the lipidation of ATG8 proteins can induce and stabilize curved membrane structures [35] and Weidberg and collaborators [31] have shown an implication of LC3s in membrane elongation while GABARAPs were more involved in autophagosome closure in mammals (Figure 1). Indeed, different *in vitro* studies have shown that GABARAP and GABARAPL2 induce the growth of vesicles leading to spherical structures, while LC3s gave rise to more elongated structures linked to the fusion between lipidic vesicles [31,55]. The involvement of ATG8 and mostly the GABARAPs during the closure of the phagophore involved their interaction with ATG2A and ATG2B. ATG2s are localized to the endoplasmic reticulum (ER) and facilitates lipid transfer from ER to the growing phagophore. The interaction between GABARAPs and ATG2s may be essential for the anchoring of the ATG2s to the

growing phagophore [56]. Moreover, ATG8 may also permit the stabilization of the phagophore by allowing the formation of a meshwork involved in vesicle biogenesis [35,57].

Despite the hypothesis that ATG8 proteins are involved in autophagosome formation and that the GABARAPs are also involved in the recruitment and activation of ULK1, and recently, PI3KC3-C1 complexes in mammals, ATG8 seems to be dispensable for autophagosome formation. Indeed, in absence of all ATG8 proteins in a mammalian cellular model, autophagosomes are fully formed, sealed and are present in equivalent number. However, autophagosome are smaller suggesting that they do not properly elongate demonstrating the importance of ATG8 in elongation [42].

Role of ATG8 proteins during fusion between autophagosomes and lysosomes

The final stage of autophagy consists in the fusion of the autophagosomes with the lysosome to induce the degradation of its content (Figure 1). The role of ATG8 proteins during the fusion step (Figure 2) may involve many mechanisms: re-localization and transport of autophagosomes thanks to their MAP (Microtubules-associated proteins) properties [58], regulation of the lysosome number and their acidification and ATG8s also act as tethering factors between autophagosome and lysosome [59–63].

Autophagosomes are formed in the peripheral region of the cells and need to migrate to meet and fuse with lysosomes mainly localized in the perinuclear portion of the cytoplasm [58] explaining that ATG8 implication in autophagosome relocalization regulate the fusion step. During the autophagosome relocalization, the LC3 proteins seems to be mostly involved. LC3 can interact directly with molecular motors such as dynein or indirectly through other proteins such as FYCO1 (Figure 2) or MAPK8IP1 (Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1) promoting autophagosome movement on the microtubules [9,64–68]. GABARAPs are also able to interact with microtubules [69] and we may hypothesize that these proteins might regulate autophagosomes transport as well. Then, GABARAPL1 can also regulate the fusion step through its implication in the lysosome number regulation increasing the lysosome number available in the cells [63].

ATG8 proteins seem to be necessary for the co-localization of autophagosomes and lysosomes but it has also been suggested that they are necessary factors for the fusion itself and mostly the GABARAPs can act as tethering factors to facilitate vesicle fusion (Figure 2). Indeed, the GABARAPs interact with the lysosomal protein PLEKHM1 (Pleckstrin homology domain containing protein family member 1) and BRUCE (BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme) to establish a bridge between autophagosomes and lysosomes [42,59,60].

Recently, it has also been shown that ATG8 can regulate STX16 (Synthaxin 16) and STX17 (Synthaxin 17) localization, components of the core membrane fusion system composed of SNAREs, regulating the proper acidification of the lysosome and the fusion between autophagosomes and lysosomes [62,70]. GABARAPs can also recruit the Golgi protein PI4KII α (Phosphatidylinositol 4-kinase II α) to the phagophore to generate phosphatidylinositol 4-phosphate to activate fusion events [61,71]. Even if the GABARAPs seems to be mostly involved during the fusion step, it appeared that in their absence, the LC3 proteins can compensate [43]. Moreover, the LC3B-II proteins can targeted GRASP55 (Golgi reassembly-stacking protein of 55kDa) to autophagosome upon glucose starvation which interact with LAMP2B (Lysosomal associated membrane protein 2B) to facilitate the fusion between lysosomes and autophagosomes [72].

The involvement of ATG8 proteins during autophagosome-lysosome fusion have been described to be dependent of their lipidation and therefore to their autophagosome localization. Indeed, overexpression of GABARAPL1 led to the activation of fusion steps whereas overexpression of GABARAPL1-G116A had no effect [41]. These results are in agreement with the previous observations highlighting the necessity of ATG8 proteins to be localized at the autophagosome membrane, as described for LC3 during autophagosome movement and for GABARAP during the recruitment of fusion factors to the autophagosome membrane (PLEKHM1, BRUCE, PI4KII α). However, LC3s and GABARAPs may present functional compensatory roles since *in vitro* studies have described that all ATG8 proteins are able to activate fusion events and that the expression of only one of the ATG8 may be sufficient to induce efficient fusion.

Role of ATG8 proteins during selective autophagy

ATG8 have also been described to be involved in selective autophagy [37]. During selective autophagy (Figure 3), lipidated ATG8 bind a cargo receptor, which is itself interacting with the cargo (mitochondria, protein aggregate, peroxisome, bacteria...) to induce its recruitment into the forming autophagic vesicle [2]. The cargo receptor interact with two conserved hydrophobic pockets of ATG8 called W-site and L-site through their AIM motif (ATG8-interaction motif) which is called LIR (LC3-interacting region) for the LC3s [73] and GIM (GABARAP-interacting motif) for the GABARAPs [74].

The specificity of selective autophagy may occur at two levels:

- i) The specificity of the function of the cargo receptor in one or several types of selective autophagy. A dozen of cargo receptors have already been described to be involved in

selective autophagy. If some of them have been described to be involved in several types of selective autophagy, *e.g.* SQSTM1 (Sequestrosome 1) which is implicated in aggrephagy, xenophagy and mitophagy [75], others have been described to be implicated, and indispensable, in only one selective autophagy, *e.g.* NIX (Nip-like protein X) in mitophagy during reticulocyte maturation [76].

- ii) The specificity of the cargo receptor to interact preferentially with only one or several ATG8 proteins. The cargo receptor SQSTM1, NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene1) and Optineurin can interact with all ATG8 [77,78]. However, during PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)-Parkin (parkinsonian protein 2) mitophagy, the GABARAPs but not the LC3 are involved [42]. Moreover, NDP52 (Nuclear dot protein 52 kDa) binds specifically LC3C during xenophagy, BNIP3 (Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3) and FUNDC1 (FUN14 domain-containing protein 1) preferentially recruit LC3B and FKBP8 (FKBP prolyl isomerase 8) preferentially recruits LC3A [79–81].

It was firstly described that the cargo receptor interacts with the ATG8 through its AIM motif but recently, it has been demonstrated that cargo receptor-ATG8 interaction preferences are also thanks to the N- and C-terminal acidic amino acids flanking the AIM motif. Atkinson and collaborators [82] have shown that the C-terminal cysteine is required for the high affinity with LC3A and LC3B while it is the aspartic amino acid which is important for LC3C. For GABARAP binding, the N- and C-terminal residues of the AIM motif are involved in the interaction.

Selective recruitments of different cargos by the ATG8 proteins induce the selective degradation of target proteins but also the selective recruitment of factors to the cytosolic side of autophagosomes which will be not degraded by the autophagy (Figure 3). Indeed, the recruitment of non-degraded proteins by the ATG8 conjugate to the outer autophagosome membrane is necessary for an efficient autophagy pathway. GABARAP induced an efficient autophagy initiation through the recruitment of ULK1 and PI3KC3-C1 complexes, and an efficient fusion through the recruitment PLEKHM1, BRUCE and PI4KII α . Moreover, LC3 induces an efficient perinuclear relocalization of autophagosomes through its interaction with microtubules and molecular motors.

Although, the ATG8 have been described to present redundant functions in cells. However, in plants, some species have more than 20 ATG8 isoforms that may contribute to the functional diversification of selective autophagy. This is why a recent study made in plants try to highlight the biochemical basis of ATG8 specialization and have shown that the N-terminal β -strand mediates discriminatory binding to the cargo receptor [83]. In cells, more studies will

be needed in the future to characterize the specific role of the ATG8 proteins in different selective autophagy pathway.

ATG8 proteins as prognosis factors and their functions in cancer

The expression and role of ATG8 proteins in cancer remain largely undescribed and controversial. Here, we focus on the study of the data available on the GABARAPs and LC3s expression in cancer compared to normal cells (Table 1) to determine if ATG8 might be used as prognosis factors. Moreover, the ATG8s pro-tumor and anti-tumor role during cancer is clarified.

The regulation of ATG8 expression

The variation of ATG8 expression in cells might be correlative to the autophagy flux in the cells. Indeed, the ATG8 proteins are currently used to monitor the autophagy flux. However, the level of ATG8 in cells might also result of a specific regulation of their expression. First, the decrease of GABARAP, GABARAPL1 and LC3 expression has been linked to epigenetics modifications in several cancers [84–86] but also to constitutive activation of intracellular pathway [87]. In MCF-7 breast cancer cells, the GABARAPL1 promoter has been shown to be highly methylated and to present a deacetylation of the histone H3 leading to chromatin condensation and decreased GABARAPL1 expression [85]. In HeLa cells, it has been shown that LC3, GABARAPL1 and GABARAPL2 expressions are repressed by the G9a methyltransferase [84]. In contrast, in the case of prostate cancers, the down-regulation of GABARAPL1 has been explained by the constitutive activation of the Akt pathway and the inactivation of the transcription factors FOXOs (Forkhead box transcription factor of the O class)[87].

ATG8 as prognosis markers for tumor progression and outcome

ATG8 as good prognosis marker

The expression and role of the ATG8 in cancer etiology still remain largely undescribed and controversial but, in numerous mRNA studies, the expression of GABARAPs has been described as down-regulated in cancers and their high expression has been linked to a favorable prognostic in hematopoietic cancer, renal cancer, prostate cancer, breast cancer and hepatocellular carcinoma [40,85,87–89](Table 1). For example, the loss of GABARAPL1 expression has been associated with a poor survival in hepatocellular carcinoma and correlated with advanced stages of neuroblastoma [40,90]. Similarly, proteins studies have confirmed the

decrease of GABARAPs expression in breast cancer and in hepatocellular carcinoma [40,91]. Similarly, it has been shown that LC3 (unspecified member) mRNA is reduced in lung cancer and LC3B low mRNA and protein is correlated with advanced stages and poor prognosis in renal carcinoma [92,93]. Moreover, LC3A mRNA high expression is correlated with a long overall survival [89]. Proteins studies have also shown that LC3 (unspecified member) is reduced in prostate, papillary thyroid cancer, cervical squamous cell carcinoma, lung cancer and that a decreased expression is correlated with advanced stages in ovary cancer [92,94–97]. Then the decrease of LC3B proteins amount has been shown to be correlated with advanced stages and poor prognosis in renal carcinoma [93] and with the presence of lymph node metastasis in gastric cancer [98]. Finally, LC3B high expression (mRNA and protein level) has been correlated with good prognosis in renal cancer [99](Table 1).

ATG8 as poor prognosis marker

In a surprising way, ATG8 can be also associated to cancer growth, aggressiveness and poor prognosis (Table 1). Indeed, high expression of GABARAPs has been associated to shorter overall survival and disease-free survival in head cancer and neck cancer (mRNA level) and in thyroid cancer, colorectal cancer (protein level)[100–102]. By the same way, LC3 protein level (unspecified member) has also been shown to be up-regulated in gastrointestinal cancers [103] and to be correlated with poor survival in hepatocellular carcinoma [104] and esophageal squamous cell carcinoma [105]. Moreover, LC3B mRNA levels have been quantified to be correlated to poor prognosis in stomach cancer and to be elevated in triple negative breast cancers respectively [89,106]. At the proteins level, LC3B has been found to be elevated in melanoma metastasis and has been associated with aggressiveness in breast [107,108].

Molecular mechanism of ATG8 implication during cancer progression

The ATG8 anti-tumor role

To determine whether GABARAPL1 could be considered as a tumor suppressor protein, several studies conducted in MCF-7 breast cancer cells, HepG2 and HepG3 hepatocellular carcinoma cells where GABARAPL1 was overexpressed and in human LNCaP prostate cancer cells and MDA-MB-436 breast cancer cells where GABARAPL1 was knocked-down have shown that GABARAPL1 indeed inhibited cell proliferation, invasion and tumor growth [41,63,87,91,109]. Similarly, GABARAP tumor suppressive functions have been studied in ovary cancers and breast cancers and the knock-down of GABARAP led to a decrease of cell viability, migration and proliferation [110]. Regarding the function of GABARAPL2 and the LC3s in cancer progression, to our knowledge, very few studies have been published. However,

a study realized in transformed embryonic human kidney cells, the HEK293 cell line, has demonstrated a role of LC3B in the inhibition of oncogene-induced senescence [39].

The tumor suppressive function of the ATG8 have been related to the degradation of oncogenic proteins or dysfunctional organelles. Indeed, ATG8 tumor suppressive functions have been previously linked to their involvement in NIX, mitochondria or SQSTM1 selective degradation [63,109,111]. The defect in the degradation of mitochondria or NIX led to the accumulation of damaged mitochondria, increased reactive oxygen species (ROS) levels, cytoskeleton re-organization and cell aggressiveness [63,112–114]. The alteration of SQSTM1 degradation has also been described to lead to the deregulation of glucose metabolism and increased tumor promotion as described in numerous cancer cases (hepatocellular, gastric, breast and prostate cancers)[112]. Moreover, GABARAP and GABARAPL1 tumor suppressive functions have been also related to their involvement in the selective degradation of Dvl2 (Dishevelled 2) since a defect of Dvl2 degradation led to the inhibition of the Wnt (Wingless-integration 1 pathway) signaling pathway and, consequently, to the decrease of tumor growth in hepatocellular carcinoma [109]. Similarly, the implication of LC3B in cancer progression has been linked to its role in Lamin B1 selective degradation [39] leading to decreased cell proliferation and induced senescence [115]. It has also been shown that Lamin B1 can interact with LC3A, LC3C and GABARAPs [39]. At last, it has been shown that the selective degradation of transcription factors implicated in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), such as SNAI1 (Snail family transcriptional repressor1) or TWIST1 (Twist family bHLH transcription factor 1), led to a decrease in tumor cell aggressiveness [116,117].

Altogether, these studies demonstrated a role for ATG8 in cancer progression, but, more recent data also highlighted the fact that the non-lipidated forms of the ATG8 proteins might also play a role in cancer which might be independent of their localization to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells [41]. Some *in vitro* studies have indeed proven the importance of the lipidation of the ATG8 proteins and their association with the autophagosome since GABARAPL1, but not GABARAPL1-G116A, led to a decrease in cell proliferation [40], clonogenicity, invasion and adhesion [41] and that LC3, but not LC3-G120A, was able to interact with Lamin B1 [39] to regulate cellular proliferation and senescence. But, other studies also demonstrated that GABARAPL1-G116A, like GABARAPL1, led to a decrease of *in vitro* cell migration and *in vivo* tumor growth [41]. These results suggested that the role of the ATG8 proteins in cancers might also be independent of their involvement in the selective degradation of specific substrates but might also involve the inhibition of important regulators of tumor formation such as MTOR, a protein implicated in tumor progression and cell proliferation

[118]. However, these results did not imply that the function of the ATG8 proteins in cancers was fully independent of their role in autophagy. Indeed, the GABARAPL1-G116A mutant, like GABARAPL1, was able to activate the initiation of autophagy via the inhibition of MTOR activity and in the activation of AMPK leading to ULK1 activation [41]. GABARAP-G116A, GABARAPL2-G116A and LC3-G120A mutants have also been designed but their involvement during cancer progression has not been fully studied yet [21,28].

To conclude, the tumor suppressive functions of ATG8 proteins appeared to be mainly linked to their function in the selective degradation of oncogenic proteins or damages organelles but recent data also suggested that the cytosolic forms of the ATG8 proteins may also play a role in tumor suppression [41]. Moreover, we cannot exclude that ATG8 tumor suppressive function may be linked to their capacity to regulate different cellular signaling pathways. Indeed, it has already been shown that GABARAP can induce cell cycle arrest through the up-regulation of p53 leading to decreased cell viability, migration and proliferation in ovary and breast cancer cells [110], but also through the down-regulation of the PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase)/Akt (Akt serine/threonine kinase) signaling pathway leading to the inhibition of the tumor angiogenesis and proliferation in ovary cancer cells [119].

The ATG8 pro-tumor role

The oncogenic function of ATG8 proteins has been studied in triple negative breast cancer cells, such as MDA-MB-231 or BT549, where the knock-down of GABARAPL1 led to a decrease in cell proliferation, invasion, apoptosis, and tumor growth and metastasis *in vivo* [120]. Similarly, it has been described that the knock-down of GABARAPL1 increase cell proliferation in prostate cancer cells because of a defect of the translocation of the androgen receptor (AR) to the nucleus. GABARAPL1 might be involved in AR scaffolding regulating its transcriptional activity [121]. Then, the role of LC3B during cancer promotion has also been suggested to involve its role in the regulation of various cellular signaling pathways. Indeed, LC3B has been described to act as a scaffold protein on the autophagosome outer membrane to allow for an efficient coordination of the Raf-MEK-ERK signaling pathway thanks to the interaction of LC3B with ERK [122]. These results suggested that an increase in LC3B could lead to an activation of the pathway, observation already made in numerous cancers such as renal, hepatocellular, lung, melanoma and thyroid cancers [123]. Similarly, it has been described that LC3B, GABARAP and GABARAPL1 induced the localization of ERK8 to the autophagosome and autophagy induction involved in cellular proliferation in chronic myeloid leukemia (CML)[124,125]. Moreover, we can hypothesize that the involvement of the ATG8 proteins in cellular trafficking could also be implicated in cancer progression. Indeed,

GABARAPs have been involved in GABA_A receptor trafficking to the plasma membrane [19] and it has been shown that the overactivation of GABA_A receptor in prostate cancer can be linked to cancer cell progression [126].

Altogether, these data demonstrated that the GABARAPs were mostly down-regulated in cancer cells and that these proteins may act as tumor suppressor whereas the expression and the role of the LC3s during cancer remains unclear and controversial. While the characterization of the ATG8 proteins as tumor suppressor seems to be linked to their implication in the selective degradation of oncogenic factors and dysfunctional organelles, more studies will be needed to confirm that the cytosolic forms of these proteins might also play a role in tumor promotion and growth, independently of their function in the autophagy process.

Conclusion

All ATG8 proteins share a high percentage of identity at the nucleotide and protein levels [15]. They all present a conserved glycine in their C-terminus, necessary and essential residue for their conjugation to a phospholipid and their association to the autophagosomes [21]. During autophagy, all ATG8 proteins have also been shown to be involved in the elongation of the phagophore and during basal and induced autophagy. However, it appeared that autophagy can also occur in absence of all ATG8 proteins but with less efficiency and in absence of one ATG8 subfamily, the other subfamily can compensate this absence. These conclusions raise the question about the redundancy or the specialization of human ATG8 proteins. Indeed, in unicellular organisms such as yeast, only one member, named ATG8, has been described, and therefore suggested that the family expanded significantly during evolution [127]. More study described the specialization of ATG8 proteins thank to their significant differences in their primary amino-acid sequences, mostly in their N-terminus [74] and in their AIM motif [128], two regions which have been described to control their interactions with partner proteins. Moreover, the amino-acid sequences around the AIM motif are also involved in the interaction specificity between cargo and ATG8. These observations permit to understand the different roles of GABARAPs and LC3s during autophagy process. Since GABARAPs mainly act as recruiters of downstream autophagy actors during the initiation of the process and during the autophagosome-lysosome fusion whereas LC3s seems to be mostly involved in autophagosome movement and relocalization.

Autophagy is a double edge sword during cancer progression since induced autophagy in the tumoral microenvironment, can provide the necessary nutrients to cancer cells to sustain their metabolism and survive following increased cellular stresses. It may also induce cancer

cells death following an excessive induced autophagy degradation. These observations suggest that inhibit or active autophagy may be good strategies to inhibit cancer progression. Indeed, Hydroxychloroquine is currently used in clinical trial to inhibit autophagy and treat ER+ breast cancers (NCT02414776)[129] while MTOR inhibitors are currently used to activate autophagy to treat metastatic pancreatic cancers (NCT00409292). However, developing more specific strategies to target individual autophagy actors without affecting the whole autophagy pathway may become a future new line of treatment but need a high knowledge of each autophagy actors during autophagy but also during cancer. During cancer progression, the GABARAPs appeared to be mainly down-regulated and the loss of expression can be use as poor prognosis factor whereas LC3s appeared to be either down-regulated or up-regulated. Nevertheless, a decrease of ATG8 expression may report a decrease of autophagy level in the cancer cells suggesting that the level of ATG8 in tumors might be only correlate to autophagy level. However, during cancer, the ATG8 expression might also be specifically regulated independently of autophagy pathway. The tumor suppressive functions of the ATG8 proteins in cancers may be independent of their role in autophagy flux but seem to be linked to their role in the selective degradation of oncogenic proteins as well as damages organelles through autophagy and their role in the regulation of the autophagy initiation. The specialization of the ATG8 described above may explain the difference between GABARAPs and LC3s during cancer progression. Nevertheless, we cannot ignore that ATG8 proteins may also present a role in immune cells implicated in antitumor immune response. Firstly, GABARAP appeared to be necessary for a good anti-tumor immune response through its implication in cytokine secretion [130]. Then the LC3s have been shown to be important for efficient extracellular antigen processing, presentation and induction of T-cell antitumor response by dendritic cells in mice [24,131]. The role of the LC3s during antigen presentation involved the LAP, a mechanism implicated in tumor growth only described for the LC3s proteins but not for GABARAPs.

Actually, target ATG8 lipidation using a specific inhibitor of ATG4B named NSC185058, has been described to sensitized cancer cells to chemotherapy in osteosarcoma and to radiotherapy in glioblastoma in mice [132,133,p.4]. The new information about the ATG8-cargo interaction specificity will permit to develop specific AIM inhibitors for each ATG8 proteins to dissect the biological role of the ATG8 for a potential therapeutic application [82]. Indeed, ATG8 protein may also be involved in genome expression reprogramming during cancer progression through the specific degradation of transcription factors or co-regulators. For example, selective autophagy has been described to be implicated in the degradation of EMT transcription factors [117] and more recently, it has been shown that GABARAPL1,

GABARAPL2 and GABARAP, but not LC3B, induced the selective degradation of the co-repressor NCoR1 (Nuclear co-receptor repressor 1) leading to the maintenance of metabolism in response to nutrient deprivation. Since the down-regulation of the co-repressor NCoR is involved in cancer progression [134], it has been suggested that the inhibition of GABARAPs expression might be a good strategy to inhibit cancer cell proliferation during nutrient starvation, a condition usually encountered in the tumor microenvironment [135].

Here we highlight that the ATG8 may have redundant roles during general autophagy process, but they also present some specialization for each GABARAP and LC3 subfamily in autophagy downstream proteins recruitment and autophagosome movement respectively. Each ATG8 members may also have specific role thank to their AIM motifs flanked by N- and C-terminal amino-acids involved in the affinity binding and specificity with partners. These properties might be used to develop new anti-cancer therapies, in particular in therapies targeting GABARAPs because of their anti-tumor role described in many cancer cases.

References

- [1] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*. 2007;9:1102.
- [2] Birgisdottir ÅB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell. Sci*. 2013;126:3237–3247.
- [3] Ashford TP, Porter KR. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biol*. 1962;12:198–202.
- [4] Fortun J, Dunn WA, Joy S, et al. Emerging Role for Autophagy in the Removal of Aggresomes in Schwann Cells. *J. Neurosci*. 2003;23:10672–10680.
- [5] Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:736905.
- [6] Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, et al. The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment. *Med Res Rev*. 2018;
- [7] He H, Dang Y, Dai F, et al. Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *J. Biol. Chem*. 2003;278:29278–29287.
- [8] Legesse-Miller A, Sagiv Y, Porat A, et al. Isolation and Characterization of a Novel Low Molecular Weight Protein Involved in Intra-Golgi Traffic. *J. Biol. Chem*. 1998;273:3105–3109.

- [9] Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* 1994;269:11492–11497.
- [10] Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, et al. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;325:639–648.
- [11] Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, et al. Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993;90:R17-21.
- [12] Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, et al. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J.* 2000;19:1494–1504.
- [13] Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, et al. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature.* 1999;397:69–72.
- [14] Xin Y, Yu L, Chen Z, et al. Cloning, Expression Patterns, and Chromosome Localization of Three Human and Two Mouse Homologues of GABAA Receptor-Associated Protein. *Genomics.* 2001;74:408–413.
- [15] Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, et al. GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy.* 2011;7:1098–1107.
- [16] Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, et al. Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron.* 2002;33:63–74.
- [17] Satoo K, Noda NN, Kumeta H, et al. The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J.* 2009;28:1341–1350.
- [18] Chen Z-W, Olsen RW. GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *Journal of Neurochemistry.* 2007;100:279–294.
- [19] Chen C, Wang Y, Huang P, et al. Effects of C-terminal modifications of GEC1 protein and gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor-associated protein (GABARAP), two microtubule-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J. Biol. Chem.* 2011;286:15106–15115.
- [20] Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy.* 2010;6:495–505.
- [21] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell. Sci.* 2004;117:2805–2812.
- [22] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* 2008;445:77–88.

- [23] Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450:1253–1257.
- [24] Münz C. Antigen Processing by Macroautophagy for MHC Presentation. *Front Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2019 Jan 28];2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342048/>.
- [25] Winer H, Fraiberg M, Abada A, et al. Autophagy differentially regulates TNF receptor Fn14 by distinct mammalian Atg8 proteins. *Nat Commun* [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 5];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6138730/>.
- [26] Betin VMS, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci*. 2009;122:2554–2566.
- [27] Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol*. 2000;151:263–276.
- [28] Scherz-Shouval R, Sagiv Y, Shorer H, et al. The COOH terminus of GATE-16, an intra-Golgi transport modulator, is cleaved by the human cysteine protease HsApg4A. *J. Biol. Chem*. 2003;278:14053–14058.
- [29] Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human Light Chain 3/MAP1LC3B Is Cleaved at Its Carboxyl-terminal Met121 to Expose Gly120 for Lipidation and Targeting to Autophagosomal Membranes. *J. Biol. Chem*. 2004;279:47704–47710.
- [30] Sou Y, Tanida I, Komatsu M, et al. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *J. Biol. Chem*. 2006;281:3017–3024.
- [31] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*. 2010;29:1792–1802.
- [32] Sou Y, Waguri S, Iwata J, et al. The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Mol Biol Cell*. 2008;19:4762–4775.
- [33] Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, et al. ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex: SEQUENCE REQUIREMENTS FOR LC3-INTERACTING REGION (LIR) MOTIFS. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287:39275–39290.
- [34] Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*. 2007;130:165–178.
- [35] Knorr RL, Nakatogawa H, Ohsumi Y, et al. Membrane Morphology Is Actively Transformed by Covalent Binding of the Protein Atg8 to PE-Lipids. *PLoS One* [Internet]. 2014

[cited 2019 Jan 23];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270758/>.

- [36] Cherra SJ, Kulich SM, Uechi G, et al. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J. Cell Biol.* 2010;190:533–539.
- [37] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 2007;282:24131–24145.
- [38] Alam J, DeHaro D, Redding KM, et al. C-Terminal Processing of GABARAP is Not Required for Trafficking of the Angiotensin II Type 1A Receptor. *Regul Pept.* 2010;159:78–86.
- [39] Dou Z, Xu C, Donahue G, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature.* 2015;527:105–109.
- [40] Liu C, Xia Y, Jiang W, et al. Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 2014;31:2043–2048.
- [41] Poillet-Perez L, Jacquet M, Hervouet E, et al. GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8:55998–56020.
- [42] Nguyen TN, Padman BS, Usher J, et al. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *The Journal of Cell Biology.* 2016;jcb.201607039.
- [43] Vaites LP, Paulo JA, Huttlin EL, et al. Systematic Analysis of Human Cells Lacking ATG8 Proteins Uncovers Roles for GABARAPs and the CCZ1/MON1 Regulator C18orf8/RMC1 in Macroautophagic and Selective Autophagic Flux. *Mol. Cell. Biol.* 2018;38:e00392-17.
- [44] Szalai P, Hagen LK, Sætre F, et al. Autophagic bulk sequestration of cytosolic cargo is independent of LC3, but requires GABARAPs. *Exp. Cell Res.* 2015;333:21–38.
- [45] Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, et al. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy.* 2009;5:973–979.
- [46] Itakura E, Kishi C, Inoue K, et al. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell.* 2008;19:5360–5372.
- [47] Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* 2017;61:585–596.
- [48] Grunwald DS, Otto NM, Park J-M, et al. GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for autophagy induction. *Autophagy.* 2019;1–15.

- [49] Joachim J, Jefferies HBJ, Razi M, et al. Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130. *Mol. Cell.* 2015;60:899–913.
- [50] Joachim J, Razi M, Judith D, et al. Centriolar Satellites Control GABARAP Ubiquitination and GABARAP-Mediated Autophagy. *Curr. Biol.* 2017;27:2123–2136.e7.
- [51] Kraft C, Kijanska M, Kalie E, et al. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J.* 2012;31:3691–3703.
- [52] Birgisdottir ÁB, Mouilleron S, Bhujabal Z, et al. Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAPL1 via LIR motifs. *Autophagy.* 2019;0:1–23.
- [53] Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, et al. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol.* 2010;190:511–521.
- [54] Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol Biol Cell.* 2008;19:3290–3298.
- [55] Landajuela A, Hervás JH, Antón Z, et al. Lipid Geometry and Bilayer Curvature Modulate LC3/GABARAP-Mediated Model Autophagosomal Elongation. *Biophys J.* 2016;110:411–422.
- [56] Bozic M, Bekerom L van den, Milne BA, et al. A conserved ATG2-GABARAP interaction is critical for phagophore closure. *bioRxiv.* 2019;624627.
- [57] Kaufmann A, Beier V, Franquelim HG, et al. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell.* 2014;156:469–481.
- [58] Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic.* 2008;9:574–587.
- [59] Ebner P, Poetsch I, Deszcz L, et al. The IAP family member BRUCE regulates autophagosome–lysosome fusion. *Nature Communications.* 2018;9:599.
- [60] McEwan DG, Dikic I. PLEKHM1: Adapting to life at the lysosome. *Autophagy.* 2015;11:720–722.
- [61] Wang H, Sun H-Q, Zhu X, et al. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:7015–7020.
- [62] Gu Y, Princely Abudu Y, Kumar S, et al. Mammalian Atg8 proteins regulate lysosome and autolysosome biogenesis through SNAREs. *EMBO J.* 2019;38:e101994.
- [63] Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, et al. The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy.* 2014;10:986–1003.

- [64] Fass E, Shvets E, Degani I, et al. Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes. *J. Biol. Chem.* 2006;281:36303–36316.
- [65] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 2008;33:109–122.
- [66] Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I, et al. Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *J. Biol. Chem.* 2005;280:24610–24617.
- [67] Pankiv S, Alemu EA, Brech A, et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol.* 2010;188:253–269.
- [68] Fu M, Nirschl JJ, Holzbaur ELF. LC3 Binding to the Scaffolding Protein JIP1 Regulates Processive Dynein-Driven Transport of Autophagosomes. *Dev Cell.* 2014;29:577–590.
- [69] Wang H, Olsen RW. Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J. Neurochem.* 2000;75:644–655.
- [70] Kumar S, Jain A, Farzam F, et al. Mechanism of Stx17 recruitment to autophagosomes via IRGM and mammalian Atg8 proteins. *J Cell Biol.* 2018;217:997–1013.
- [71] Albanesi J, Wang H, Sun H-Q, et al. GABARAP-mediated targeting of PI4K2A/PI4KII α to autophagosomes regulates PtdIns4P-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2015;11:2127–2129.
- [72] Zhang X, Wang L, Lak B, et al. GRASP55 Senses Glucose Deprivation through O-GlcNAcylation to Promote Autophagosome-Lysosome Fusion. *Dev. Cell.* 2018;45:245–261.e6.
- [73] von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, et al. LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Mol Cell.* 2012;48:329–342.
- [74] Rogov VV, Stolz A, Ravichandran AC, et al. Structural and functional analysis of the GABARAP interaction motif (GIM). *EMBO Rep.* 2017;18:1382–1396.
- [75] Xu Z, Yang L, Xu S, et al. The receptor proteins: pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2015;47:571–580.
- [76] Novak I, Kirkin V, McEwan DG, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 2010;11:45–51.
- [77] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011;7:279–296.

- [78] Wild P, Farhan H, McEwan DG, et al. Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth. *Science*. 2011;333:228–233.
- [79] Bhujabal Z, Birgisdottir ÅB, Sjøttem E, et al. FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep*. 2017;18:947–961.
- [80] Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, et al. Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *J Biol Chem*. 2012;287:19094–19104.
- [81] Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol*. 2012;14:177–185.
- [82] Atkinson JM, Ye Y, Gebru MT, et al. Time-resolved FRET and NMR analyses reveal selective binding of peptides containing the LC3-interacting region to ATG8 family proteins. *J. Biol. Chem*. 2019;
- [83] Zess EK, Jensen C, Cruz-Mireles N, et al. N-terminal β -strand underpins biochemical specialization of an ATG8 isoform. *PLoS Biol*. 2019;17:e3000373.
- [84] Artal-Martinez de Narvajas A, Gomez TS, Zhang J-S, et al. Epigenetic Regulation of Autophagy by the Methyltransferase G9a. *Mol Cell Biol*. 2013;33:3983–3993.
- [85] Hervouet E, Claude-Taupin A, Gauthier T, et al. The autophagy GABARAP1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer*. 2015;15:729.
- [86] Klebig C, Seitz S, Arnold W, et al. Characterization of γ -aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:394–400.
- [87] Su W, Li S, Chen X, et al. GABARAP1 suppresses metastasis by counteracting PI3K/Akt pathway in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;8:4449–4459.
- [88] Brigger D, Torbett BE, Chen J, et al. Inhibition of GATE-16 attenuates ATRA-induced neutrophil differentiation of APL cells and interferes with autophagosome formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;438:283–288.
- [89] Uhlen M, Zhang C, Lee S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357.
- [90] Roberts SS, Mori M, Pattee P, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J. Clin. Oncol*. 2004;22:4127–4134.
- [91] Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2010;102:1024–1031.
- [92] Jiang Z-F, Shao L-J, Wang W-M, et al. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol. Biol. Rep*. 2012;39:259–267.

- [93] Deng Q, Wang Z, Wang L, et al. Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2013;43:1261–1268.
- [94] Liu C, Xu P, Chen D, et al. Roles of autophagy-related genes Beclin-1 and LC3 in the development and progression of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Biomed Rep.* 2013;1:855–860.
- [95] Hu Y-F, Lei X, Zhang H-Y, et al. Expressions and clinical significance of autophagy-related markers Beclin1, LC3, and EGFR in human cervical squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2015;8:2243–2249.
- [96] Shen Y, Liang L-Z, Hong M-H, et al. [Expression and clinical significance of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin1 in epithelial ovarian cancer]. *Ai Zheng.* 2008;27:595–599.
- [97] Li X, Lin X, Ma H. Overexpression of LC3 in Papillary Thyroid Carcinomas and Lymph Node Metastases. *Acta Chir. Belg.* 2015;115:356–363.
- [98] Yu S, Li G, Wang Z, et al. Low expression of MAP1LC3B, associated with low Beclin-1, predicts lymph node metastasis and poor prognosis of gastric cancer. *Tumor Biol.* 2016;37:15007–15017.
- [99] Wu S, Sun C, Tian D, et al. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:3882–3891.
- [100] Keulers TG, Schaaf MBE, Peeters HJM, et al. GABARAPL1 is required for increased EGFR membrane expression during hypoxia. *Radiotherapy and Oncology.* 2015;116:417–422.
- [101] Roberts SS, Mendonça-Torres MC, Jensen K, et al. GABA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Pathol. Oncol. Res.* 2009;15:645–650.
- [102] Miao Y, Zhang Y, Chen Y, et al. GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatogastroenterology.* 2010;57:257–261.
- [103] Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int. J. Oncol.* 2008;33:461–468.
- [104] Wu W-Y, Kim H, Zhang C-L, et al. Clinical significance of autophagic protein LC3 levels and its correlation with XIAP expression in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* 2014;31:108.
- [105] Chen Y, Li X, Wu X, et al. Autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 impact the efficacy of chemoradiation on esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 2013;209:562–567.

- [106] Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, et al. Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy*. 2014;10:2122–2142.
- [107] Lazova R, Camp RL, Klump V, et al. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis and poor outcome. *Clin Cancer Res*. 2012;18:370–379.
- [108] Peng Y-F, Shi Y-H, Shen Y-H, et al. Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PLoS ONE*. 2013;8:e74407.
- [109] Zhang Y, Wang F, Han L, et al. GABARAPL1 negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell. Physiol. Biochem*. 2011;27:503–512.
- [110] Rho SB, Byun H-J, Kim B-R, et al. GABAA receptor-binding protein promotes sensitivity to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Int. J. Oncol*. 2013;42:1807–1814.
- [111] Islam MdA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 22];19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983640/>.
- [112] Rodger CE, McWilliams TG, Ganley IG. Mammalian mitophagy – from in vitro molecules to in vivo models. *FEBS J*. 2018;285:1185–1202.
- [113] Schwarten M, Mohrlüder J, Ma P, et al. Nix directly binds to GABARAP: a possible cross-talk between apoptosis and autophagy. *Autophagy*. 2009;5:690–698.
- [114] Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*. 2011;25:795–800.
- [115] Shimi T, Butin-Israeli V, Adam SA, et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev*. 2011;25:2579–2593.
- [116] Grassi G, Di Caprio G, Santangelo L, et al. Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death and Disease*. 2015;6:e1880.
- [117] Zada S, Hwang JS, Ahmed M, et al. Control of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis by Autophagy-Dependent SNAI1 Degradation. *Cells*. 2019;8.
- [118] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149:274–293.
- [119] Park SH, Kim B-R, Lee JH, et al. GABARBP down-regulates HIF-1 α expression through the VEGFR-2 and PI3K/mTOR/4E-BP1 pathways. *Cell. Signal*. 2014;26:1506–1513.
- [120] Ran L, Hong T, Xiao X, et al. GABARAPL1 acts as a potential marker and promotes tumor proliferation and metastasis in triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8:74519–74526.

- [121] Su B, Zhang L, Liu S, et al. GABARAPL1 Promotes AR+ Prostate Cancer Growth by Increasing FL-AR/AR-V Transcription Activity and Nuclear Translocation. *Front Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Dec 13];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6872515/>.
- [122] Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Mishall P, et al. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [cited 2019 Feb 6];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868163/>.
- [123] Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, et al. Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway. *Seminars in Oncology*. 2006;33:392–406.
- [124] Colecchia D, Strambi A, Sanzone S, et al. MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy*. 2012;8:1724–1740.
- [125] Colecchia D, Rossi M, Sasdelli F, et al. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy*. 2015;11:1790–1802.
- [126] Takehara A, Hosokawa M, Eguchi H, et al. γ -Aminobutyric Acid (GABA) Stimulates Pancreatic Cancer Growth through Overexpressing GABAA Receptor π Subunit. *Cancer Res*. 2007;67:9704–9712.
- [127] Abdollahzadeh I, Schwarten M, Gensch T, et al. The Atg8 Family of Proteins—Modulating Shape and Functionality of Autophagic Membranes. *Front Genet* [Internet]. 2017;8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581321/>.
- [128] Kalvari I, Tsompanis S, Mulakkal NC, et al. iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy*. 2014;10:913–925.
- [129] Bishop E, Bradshaw TD. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3669-6>.
- [130] Salah FS, Ebbinghaus M, Muley VY, et al. Tumor suppression in mice lacking GABARAP, an Atg8/LC3 family member implicated in autophagy, is associated with alterations in cytokine secretion and cell death. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2205.
- [131] Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, et al. Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity*. 2010;32:654–669.
- [132] Akin D, Wang SK, Habibzadegah-Tari P, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors. *Autophagy*. 2014;10:2021–2035.

- [133] Huang T, Kim CK, Alvarez AA, et al. MST4 Phosphorylation of ATG4B Regulates Autophagic Activity, Tumorigenicity, and Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2017;32:840-855.e8.
- [134] Wong MM, Guo C, Zhang J. Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2:169–187.
- [135] Saito T, Kuma A, Sugiura Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1. *Nature Communications*. 2019;10:1567.

Figure legends

Table 1. ATG8 expression in cancers is correlated with a favorable prognosis or an unfavorable prognosis depending on tumor type.

Figure 1. Role of ATG8 proteins during the Autophagy pathway

Top: Molecular mechanism of autophagy

① Autophagy is induced by cellular stresses (hypoxia, amino acid (AA) starvation...), AMPK activation and MTOR inactivation leading to ULK1 activation and recruitment to the phagophore. ② LC3s and GABARAPs proteins, previously cleaved by ATG4 proteases, are then conjugated to a phosphatidylethanolamine (PE) or a phosphatidylserine (PS) to give the membrane-bound forms of these proteins, LC3s-II and GABARAPs-II. ③ These proteins then play a major role in phagophore elongation and the GABARAPs during closure. ④ The closed autophagosome is then relocalized to the perinuclear space thanks to its interaction with the microtubules ⑤ where it fuses with a lysosome to induce the degradation of its content.

❶ GABARAPL1 is implicated in MTOR inactivation and AMPK activation leading to ULK1 activation. ❷ GABARAP has also been described to be involved in ULK1 activation and GABARAPL1, like GABARAP, is more efficient in the recruitment of ULK1 to the autophagosome than the LC3s proteins. ❸ The PI3KC3-C1 complex, composed of PI3KC3, ATG14 and other proteins, is recruited to the phagophore through its interaction with ATG8 proteins, but interact preferentially with GABARAP and GABARAPL1, inducing the phosphorylation of ATG14 by ULK1 and then the activation of this complex.

ER: endoplasmic reticulum

Bottom: Involvement of GABARAPs (GBPs) and LC3B proteins during the early and late stages of autophagy in mammals.

✓ High implication; ✓ Low implication; ✗ Not described to be implicated in mammals

Figure 2. Proposed model describing the role of ATG8 proteins during the late stages of autophagy

ATG8 proteins induce ① autophagosome intracellular relocalization through their interaction with FYCO1 or MAPK8IP1 (a) which binds microtubule molecular motors. ATG8 proteins can also directly bind microtubules (b) or molecular motors, such as dynein (c), to redistribute autophagosomes in cells.

ATG8 proteins also induce ② autophagosome-lysosome fusion through their interaction with PLEKHM1 or BRUCE (a), two lysosomal proteins, or through PI4KII α recruitment (b) from the Golgi apparatus to facilitate fusion events.

AP: Autophagosome; MTOC: Microtubule-organizing center.

Figure 3. Schematic representation of ATG8 involvement during selective autophagy and recruitment.

① ATG8 are dock at the autophagosome membrane by their lipidation and act as recruiters of proteins which will not be degraded through autophagy to the autophagosome external membrane side to an efficient autophagosome formation as GABARAP proteins in ULK1, PI3KC3-C1 complexes recruitment during early stage of autophagy or with the lysosomal proteins BRUCE, PLEKHM1, ATG2, PI4KII α during autophagosome-lysosome fusion

② During selective autophagy, ATG8 interact with the cargo receptor (CR) through the W and L hydrophobic pockets of ATG8 with the AIM of the CR. The CR interacts with the ubiquitinated cargo to degrade (mitochondria, protein aggregate).

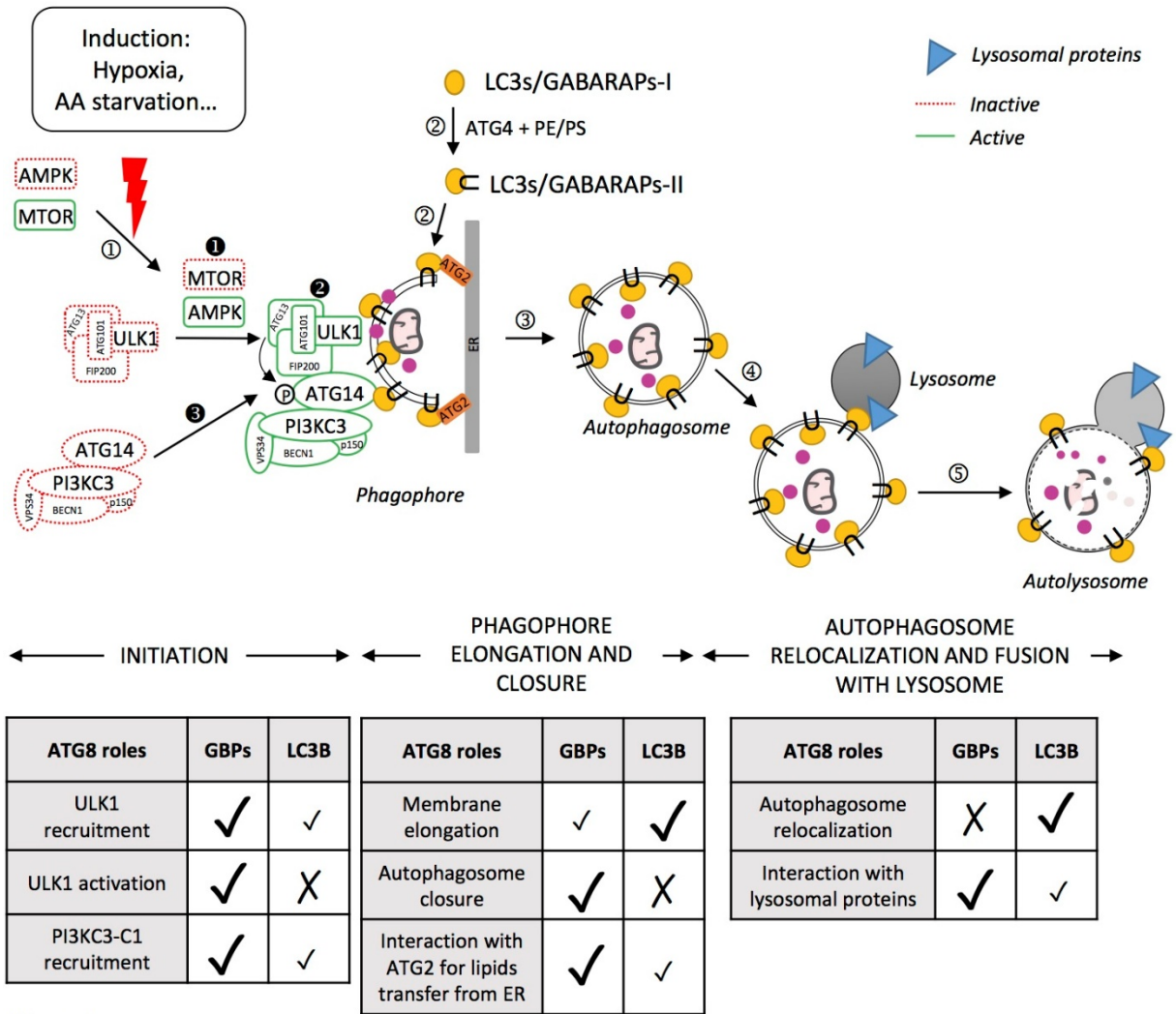


Figure 1.

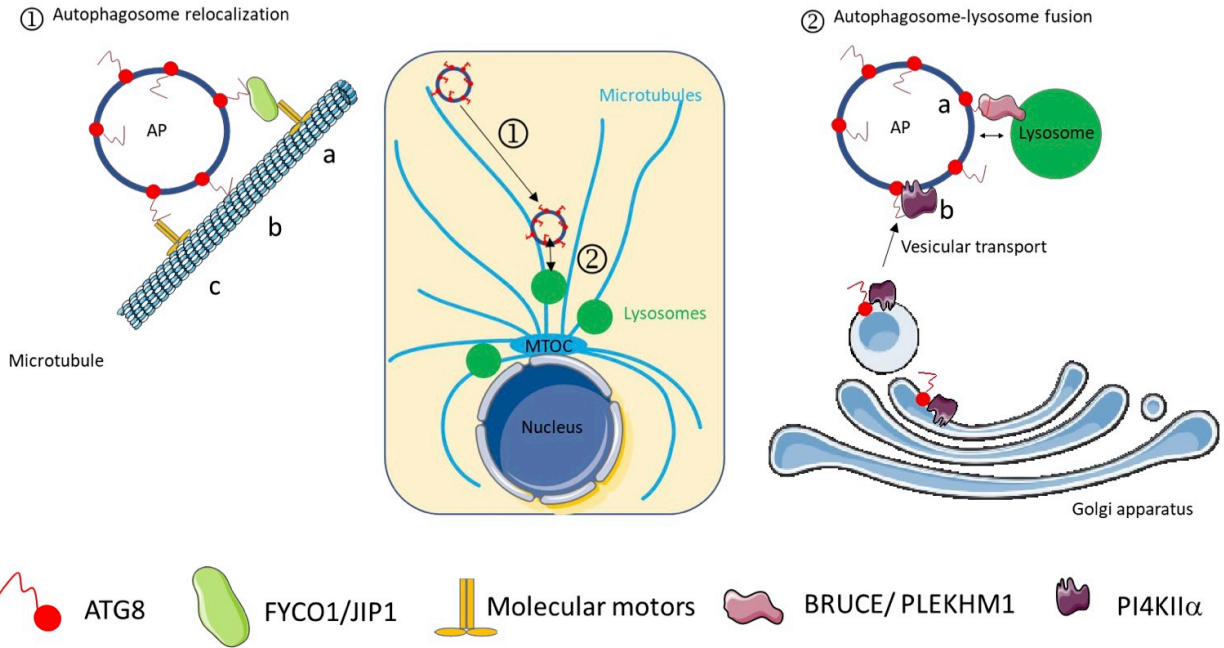


Figure 2.

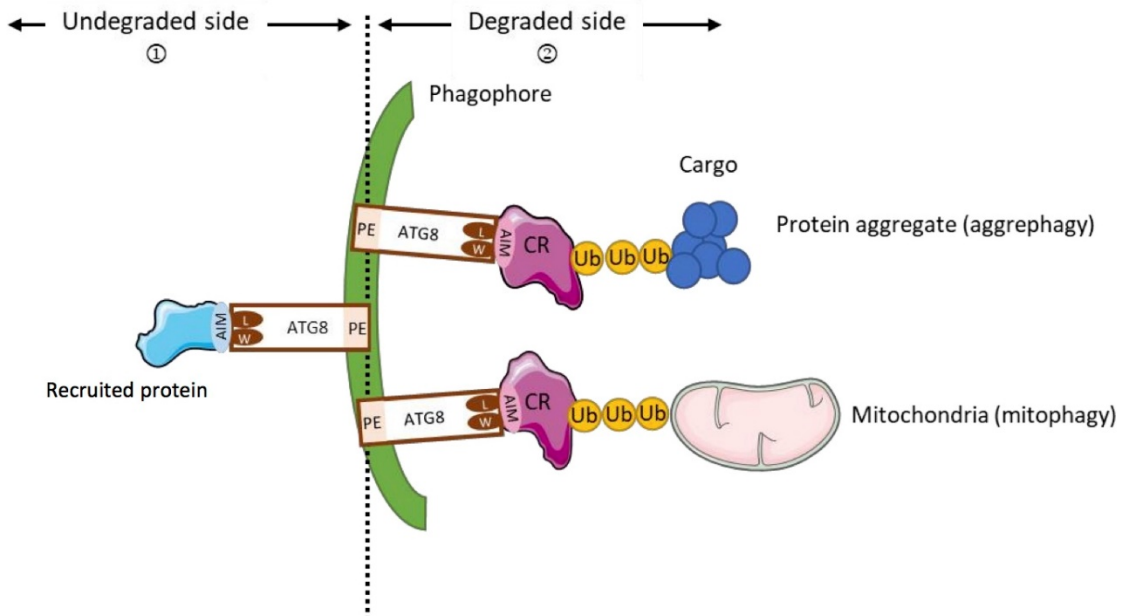


Figure 3.

	Good prognosis			Poor prognosis			
	Tumor types	mRNA study	protein study	Tumor types	mRNA study	protein study	
GABARAPs	GABARAP	Pancreatic cancer [89]	High expression associated with long overall survival, Kaplan Meier curve		Colorectal cancer [102]	High expression is associated with short overall survival, Kaplan Meier curve	
		Neuroblastome [90]	High expression associated with long overall survival, Kaplan Meier curve		Thyroid cancer [101]	High expression in cancers compared to normal cells in patient	
		Liver cancer [40]	Low expression in cancer cells compare to normal tissu in patient		Adenoma [101]	High expression in cancer cells compared to normal tissues in patient	
	GABARAPL1	Hematopoietic tumor (AML) [88, 89]	Low expression in cancer cells compare to normal tissues in patient		Head and neck cancer [100]	High expression correlated with poor clinical outcome	
		Renal cancer [87]	High expression is associated with long overall survival		Triple negative breast cancer [120]	High expression in tumor cells compare to normal cells	
		Prostate cancer [87, 121]	Low expression in cancer cells compare to normal tissues in patient Low expression correlated with shorter diseases free time and with aggressivness	Low expression of GABARAPL1 correlated with shorter survival rate		High expression associated with short overall survival and disease free survival, Kaplan Meier curve	
		Breast cancer [85, 81]	Expression decrease with stage advancement				
	Liver cancer [40, 89]	Low expression in cancer cells compare to normal tissues in patient High expression is correlated with long overall survival, Kaplan Meier curve	Low expression in cancer cells compare to normal cells in patient				
	GABARAPL2	Renal cancer [89]	High expression is associated with long overall survival		Head and neck cancer [89]	High expression is associated with short overall survival, Kaplan Meier curve	
		Breast cancer [85]	Low expression in cancer cells compared to normal cells				
Hematopoietic tumor (AML) [88]		Low expression in cancer cells compared to normal cells					
LC3s	LC3 (unspecified member)	Ovary cancer [96]	Expression decreased with stage advancement Low expression in cancer cells compare to normal tissues in patient		Gastro-intestinal cancer [103]	High expression in cancer cells compare to normal cells in patient	
		Prostate cancer [94]	Low expression in cancer cells compare to normal tissues in patient		Hepatocellular carcinoma [104]	High expression in cancer cells compare to normal cells in patient High expression associated with advances tumor stage	
		lung cancer [92]	Low expression in cancer cells compare to normal tissu in patient	Low expression in cancer cells compare to normal tissu in patient			
		cervical squamous carcinoma [95]	Low expression in cancer cells compare to normal tissu in patient				
	papillary thyroid cancer [97]	Low expression in cancer cells compare to normal tissu in patient					
	LC3A	Pancreatic cancer [89]	High expression is associated with long overall survival, Kaplan Meier curve				
	LC3B	Renal carcinoma [89, 93]	High expression is associated with long overall survival, Kaplan Meier curve Low expression in cancer cells compared to normal tissues in patient	High expression is associated with long overall survival, Kaplan Meier curve Low expression in cancer cells compared to normal tissues in patient	esophageal squamous carcinoma [105]	High expression is associated with short overall survival, Kaplan Meier curve	
		Gastric cancer [98]	Low expression in cancer cells compared to normal tissues in patient High expression is associated with long overall survival, Kaplan Meier curve		breast cancer [106, 108]	High expression is associated with short overall survival, Kaplan Meier curve (triple negative breast cancer) High expression in cancer cells compares to normal tissues in patient (triple negative breast cancer)	High expression is associated with aggressivness
					Melanoma [107]	High expression in metastasis compare to primary tumors	
				Stomach cancer [89]	High expression is associated with short overall survival, Kaplan Meier curve		
LC3C			Endometrial cancer [89]	High expression is associated with short overall survival, Kaplan Meier curve			

Table. 1

II. Etude du rôle de GABARAPL1 dans la formation des métastases

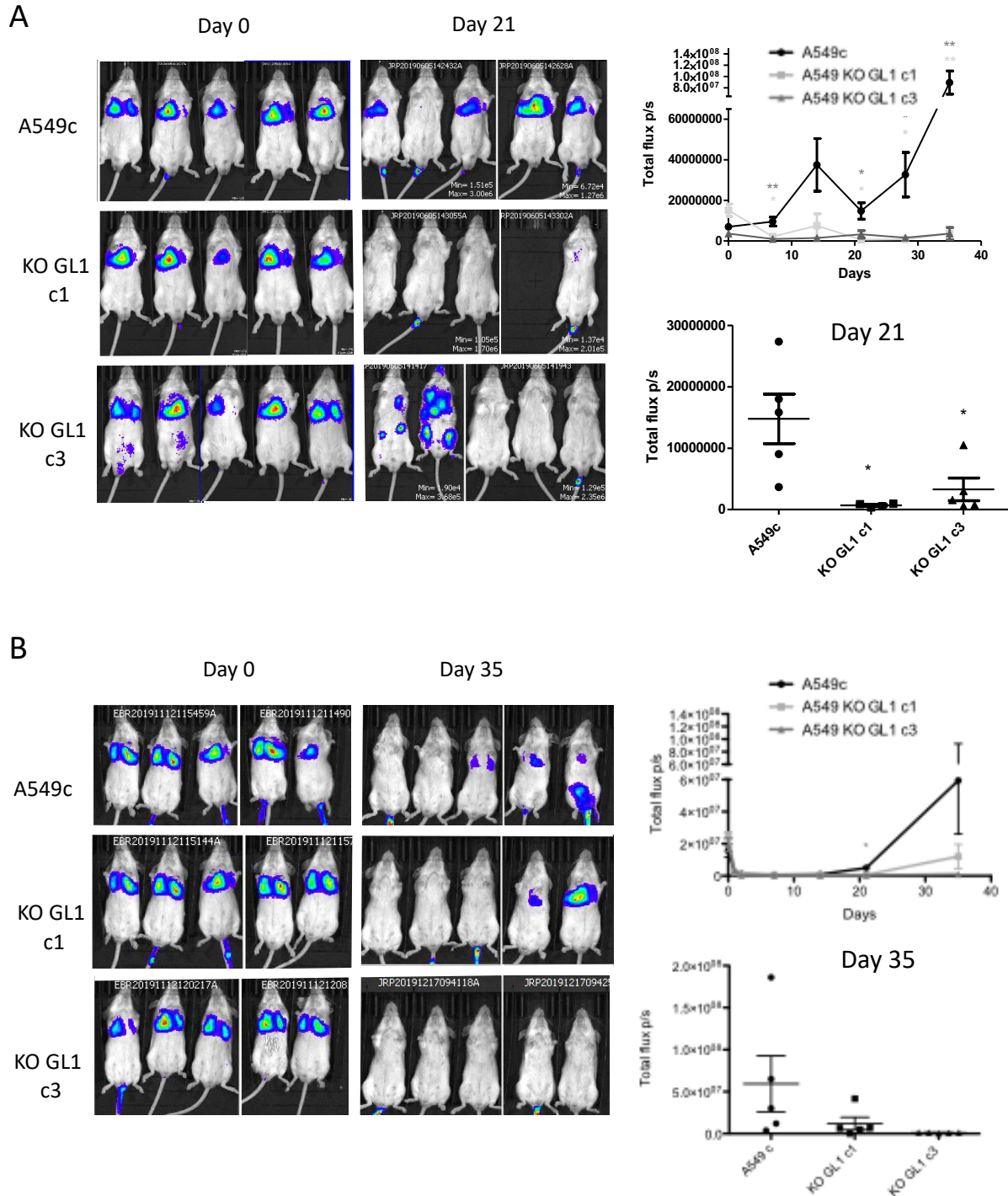


Figure 16 : Etude de l'impact de l'inactivation de GABARAPL1 sur la formation des métastases in vivo

Les cellules A549c luc, KO GABARAPL1 c1 luc et c3 luc exprimant la luciférase ont été injectées dans la veine de la queue de souris SCID. La formation des métastases a été suivie par étude de la bioluminescence du corps entier des souris (Total photon flux). Deux expériences ont été réalisées. Les résultats de l'expérience 1 sont présentés en A, et les résultats de l'expérience 2 sont présentés en B.

Du fait de l'implication de la TEM dans la formation des métastases et du rôle de GABARAPL1 dans la TEM, nous nous sommes intéressés à l'implication de GABARAPL1 dans la formation des métastases *in vivo*. Pour cela, nous avons injecté les cellules A549c luc et KO GABARAPL1 luc exprimant la luciférase dans la veine de la queue de souris SCID. Le suivi de la formation des métastases a été réalisé par suivi de la bioluminescence. Nous avons réalisé une première expérience où nous avons montré que l'injection des cellules A549c conduit à la formation de métastases très rapidement, dès le jour 7 avec l'apparition des premiers foyers métastatiques détectables. De manière surprenante, bien que les cellules KO GABARAPL1 soient plus engagées en TEM que les cellules contrôles, les souris ayant reçu les cellules A549 KO GABARAPL1 luc forment moins de métastases que les souris ayant reçu les cellules A549c luc (Figure 16A). Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé une seconde expérience. Dans cette seconde expérience, les souris ayant reçu les cellules A549c forment peu de métastases et elles apparaissent beaucoup plus tardivement que lors de la première expérience (jour 21). Malgré le fait qu'au jour 35, de manière similaire à ce que nous avons montré dans la première expérience, la quantification de la bioluminescence semble montrer que les souris ayant reçu les cellules A549c forment plus de métastases que les souris ayant reçu les cellules KO GABARAPL1, les résultats ne sont pas statistiques. Une troisième expérience sera réalisée afin de déterminer quel est le rôle réel de GABARAPL1 dans la formation des métastases.

Bien que la TEM semble nécessaire lors de la formation des métastases, de récentes publications suggèrent que la TEM serait plutôt impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements et à l'échappement des cellules au système immunitaire (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015). De plus, la TEM interviendrait plutôt dans les étapes précoces de la formation des métastases (envahissement du tissu, intravasation et extravasation). En revanche, il semblerait qu'une réversion de la TEM soit plutôt nécessaire à l'établissement d'une tumeur secondaire. Dans notre étude, les cellules ont été directement injectées dans la circulation sanguine, ainsi les premières étapes d'envahissement et d'intravasation ne sont pas étudiées.

III. Etude du rôle de la double invalidation GABARAPL1/GABARAP dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules cancéreuses

Les protéines GABARAP, comme toutes les protéines de la famille ATG8, sont impliquées dans la dégradation par autophagie sélective. Elles permettent le recrutement de protéines par une interaction avec la séquence AIM (ATG8-interacting motif) des protéines cibles, appelée GIM (GABARAP-interacting motif) pour les protéines GABARAP (Rogov et al., 2017). Il a également été décrit que les protéines GABARAP ne recrutent pas avec la même efficacité des protéines cibles du fait de l'existence

d'une variabilité des acides aminés encadrant le motif AIM mais également au sein du motif AIM. Ces variabilités expliquent qu'une protéine cible puisse avoir plus d'affinité envers un même membre de la sous-famille GABARAP (Wirth et al., 2019). De plus, les protéines GABARAP et GABARAPL1 possèdent 87% d'identité ce qui pourrait expliquer une redondance fonctionnelle de ces protéines lors de l'autophagie sélective. Nous nous sommes ainsi demandé quel était l'impact de l'inactivation de GABARAP dans les cellules A549 déjà invalidées pour GABARAPL1 sur l'autophagie et sur la TEM. Les principales expériences ont été réalisées dans les cellules A549.

1. Obtention des modèles cellulaires

Les modèles cellulaires A549 DKO GABARAPL1/GABARAP (A549 DKO GL1/GBP) et ACHN DKO GABARAPL1/GABARAP (ACHN DKO GL1/GBP) ont été réalisés par la technique CRISPR/Cas9 dans les cellules A549 KO GABARAPL1 c1 et ACHN KO GABARAPL1 cA précédemment obtenus. L'extinction de GABARAP a été vérifiée par Western blot en présence d'inhibiteur de la dégradation autophagique NH₄Cl ou du protéasome Bortezomib. Un clone A549 DKO GL1/GBP a été obtenu (DKO I) et trois clones ACHN DKO GL1/GBP ont été obtenus (DKO A, B et C)(Figure 17).

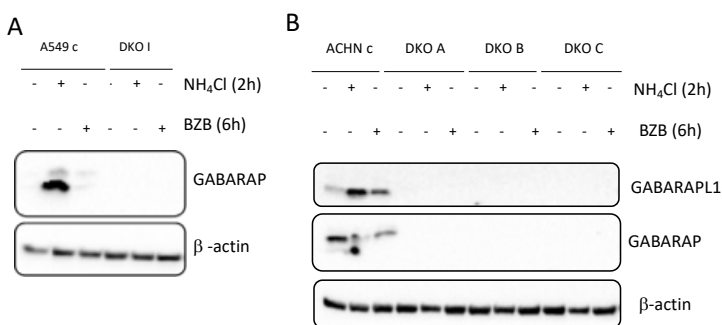


Figure 17 : Modèles cellulaires A549 DKO GL1/GBP et ACHN DKO GL1/GBP.

A. Analyse par Western blot du taux protéique de GABARAP dans les cellules A549c et DKO I au niveau basal et en présence ou non de NH₄Cl 50 mM pendant 2 h et de Bortezomib 200 nM pendant 6h.

B. Analyse par Western blot du taux protéique de GABARAP et de GABARAPL1 dans les cellules ACHNc, DKO GL1/GBP cA, cB et cC (DKO A, DKO B et DKO C) au niveau basal et en présence ou non de NH₄Cl 50 mM pendant 2 h et de Bortezomib 50 nM pendant 6 h. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

2. Impact de la double invalidation GABARAPL1/GABARAP sur l'autophagie

Nous avons initialement étudié l'impact de la double invalidation GL1/GBP sur l'expression des principaux membres de la famille ATG8 dans les cellules A549. La double invalidation GL1/GBP conduit à une diminution du taux d'ARNm GABARAPL1 et GABARAP, augmente le taux d'ARNm GABARAPL2 et ne modifie pas le taux d'ARNm LC3B (Figure 18A). Nous avons ainsi étudié le taux protéique de GABARAPL2. Au niveau basal, le taux de GABARAPL2 est supérieur dans les cellules A549 DKO I par rapport aux cellules contrôles. En revanche, en présence de NH₄Cl, l'accumulation de GABARAPL2 est inférieure dans les cellules DKO I par rapport aux cellules contrôles dans les mêmes conditions (Figure 18B). Ces résultats suggèrent que l'inactivation de GABARAP et GABARAPL1 pourrait être compensée par une surexpression de GABARAPL2 alors que la simple invalidation de GABARAPL1 n'était pas compensée par une surexpression d'un autre membre de la sous-famille. Toutefois, le taux

protéique de GABARAPL2 en présence de NH₄Cl est inférieur dans les cellules DKO I par rapport aux cellules contrôles puisqu'il rend compte du flux autophagique ce qui suggère qu'il y a plus de GABARAPL2 disponible dans les cellules DKO I que dans les cellules contrôles mais que le flux autophagique basal est trop faible pour permettre sa consommation. En revanche, dans les cellules contrôles le flux est rapide et permet une forte dégradation et donc une forte accumulation d'autophagosomes en présence d'inhibiteur. Nous avons ainsi voulu confirmer ces résultats sur le flux autophagique en étudiant le taux de LC3B-II par Western blot. Le taux de LC3B-II dans les cellules A549c DKO I est inférieur à celui des cellules A549c et des cellules KO GABARAPL1 alors que nous avons montré un taux de LC3B-II équivalent entre les cellules A549c et A549 KO GABARAPL1 (**Publication II**). De plus, en présence de NH₄Cl, on observe une forte accumulation de LC3B-II dans les cellules contrôles, similaires également aux cellules KO GABARAPL1, alors qu'on observe qu'une très faible accumulation de LC3B-II dans les cellules DKO I (Figure 18C).

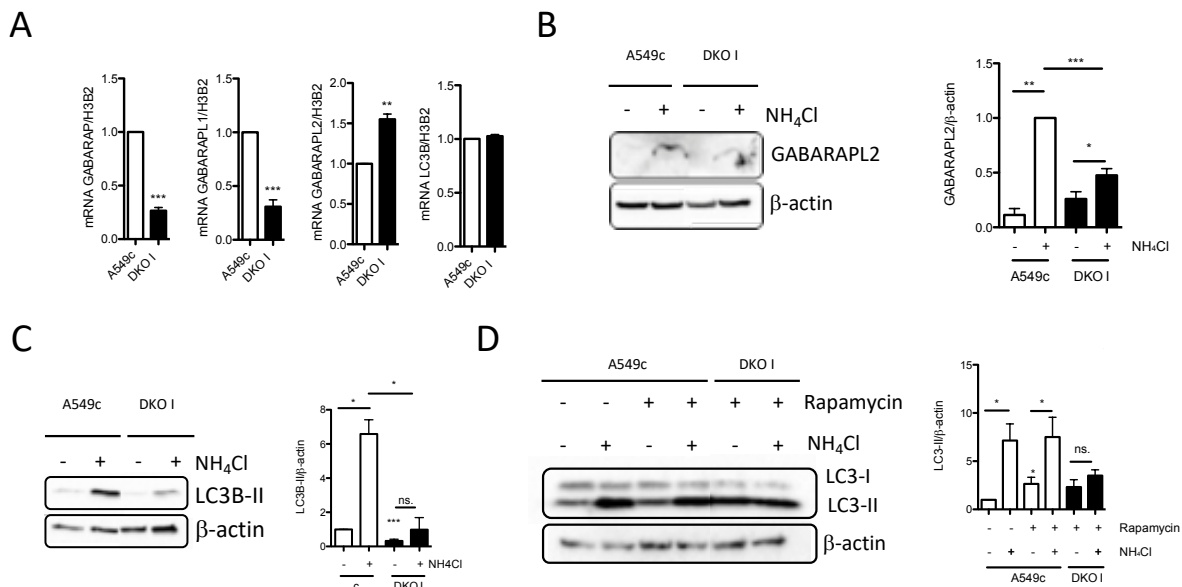


Figure 18 : Etude de l'impact de la double invalidation GL1/GBP sur l'autophagie

A. Etude du taux basal des ARNm GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 et LC3B par RT-qPCR dans les cellules A549c et DKO GL1/GBP (DKO I). **B.** Etude par Western blot du taux protéique de GABARAPL2 dans les cellules A549c et DKO GL1/GBP (DKO I) non traitées ou traitées au NH₄Cl 50 mM pendant 2 h. **C.** Etude par Western blot du taux protéique de LC3B-II dans les cellules A549c et DKO GL1/GBP (DKO I) non traitées ou traitées au NH₄Cl 50 mM pendant 2 h. **D.** Etude par Western blot du taux protéique de LC3B-II dans les cellules A549c et DKO GL1/GBP (DKO I) traitées ou non à la rapamycine 10 mM pendant 4 h avec ou sans NH₄Cl 50 mM pendant 2 h. Les données d'au moins 3 expériences indépendantes sont présentées \pm S.E.M. $P^* < 0,05$ comparé aux cellules contrôles. Le test T de Student a été utilisé.

Lors de l'induction de l'autophagie par la rapamycine, dans les cellules contrôles, on observe une augmentation du taux de LC3B-II, puis une accumulation en présence de NH₄Cl. En revanche, dans les cellules DKO I, le taux de LC3B-II est légèrement augmenté en présence de rapamycine mais LC3B-II ne s'accumule pas lors de l'ajout de NH₄Cl (Figure 18D). Ces résultats suggèrent que la double invalidation de GL1/GBP inhibe le flux autophagique basal et induit alors que nous avons montré que l'invalidation de GABARAPL1 ne modifiait pas le flux autophagique induit (données non montrées).

3. Impact de la double invalidation GABARAPL1/GABARAP sur la TEM

Nous avons initialement montré que l'invalidation de GABARAPL1 conduisait à un engagement en TEM des cellules A549 et ACHN. Nous avons alors étudié l'impact de la double invalidation GL1/GBP dans les cellules A549. Nous avons montré que, comme dans les cellules KO GL1, le taux de N-Cadhérine est supérieur dans les cellules DKO par rapport aux cellules A549c. En revanche, le taux protéique de E-Cadhérine est équivalent entre les cellules A549c et DKO, voir même légèrement mais pas significativement supérieur dans les cellules DKO, alors qu'il est diminué dans les cellules KO GL1 (Figure 19A) suggérant que l'invalidation de GABARAP dans les cellules KO GL1 restaure le taux de E-Cadhérine. Des résultats équivalents ont été observés au niveau des ARNm *CDH1/E-Cadhérine* et *CDH2/N-Cadhérine* (Figure 19B). Nous avons montré que l'engagement en TEM des cellules KO GL1 est dû à une augmentation du taux de SNAI1 qui permet la régulation de l'expression des gènes cibles *CDH1/E-Cadhérine* et *CDH2/N-Cadhérine*. De manière similaire, le taux protéique de SNAI1 est augmenté dans les cellules DKO par rapport aux cellules A549c (Figure 19C) et cette augmentation est également due à une augmentation du taux d'ARNm de *SNAI1* (Figure 19D) alors que la stabilité de l'ARNm *SNAI1* est équivalente entre les cellules DKO et A549c suggérant une augmentation de la transcription de *SNAI1*. Une des voies impliquées dans la régulation de l'expression de *SNAI1* est la voie SMAD. Nous avons montré que l'augmentation de l'ARNm *SNAI1* observée dans les cellules A549 KO GL1 est due à une augmentation du taux protéique des facteurs de transcription SMAD du fait de l'inhibition de leur dégradation par autophagie dans les cellules KO GL1. De manière similaire, nous avons observé une augmentation du taux protéique de SMAD2 et SMAD3 dans les cellules DKO (Figure 19F) alors que le taux de leur ARNm reste inchangé (Figure 19G). De plus, les protéines SMAD sont dégradées par autophagie dans les cellules A549c alors qu'elles ne le sont plus dans les cellules DKO puisque l'inhibition de la dégradation autophagique ne conduit pas à une accumulation de ces protéines dans les cellules DKO (Figure 19F). Nous avons également étudié le caractère invasif des cellules DKO. Nous avons montré que l'invalidation de GABARAPL1 conduisait à une augmentation de l'invasion des cellules. En revanche, la double invalidation GABARAPL1/GABARAP inhibe l'invasion cellulaire (Figure 19H) probablement du fait du taux important de E-Cadhérine.

Nous avons alors montré que l'invalidation de GABARAPL1 ne modifiait pas le flux autophagique basal et induit (Données non montrées) alors que la double invalidation GL1/GBP conduit à une inhibition du flux basal et induit. De plus, nous avons montré que les cellules doublement invalidées pour GABARAPL1 et GABARAP comme les cellules KO GABARAPL1 ont une augmentation du taux transcriptionnel de SNAI1 du fait d'une diminution de la dégradation des facteurs de transcription SMAD par autophagie. Toutefois, l'invalidation de GABARAPL1 conduit à une augmentation de l'invasion des

cellules, ce qui est cohérent avec le taux des marqueurs E-Cadhérine et N-Cadhérine étudiés. En revanche, les cellules DKO GL1/GBP ne sont plus du tout invasives ce qui pourrait être expliqué par la forte expression de la E-Cadhérine, décrite comme inhibant la mobilité cellulaire.

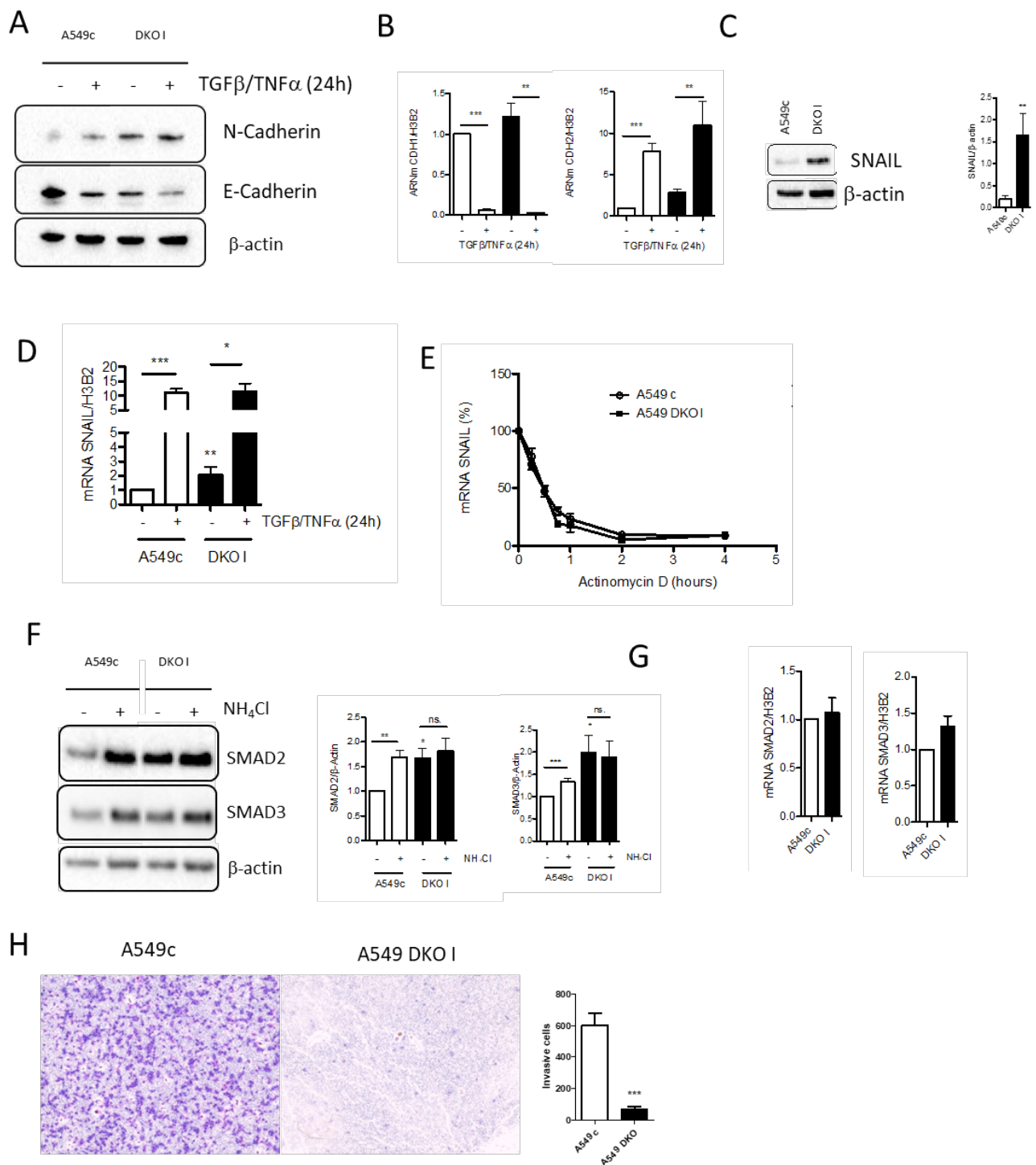


Figure 19 : Impact de la double invalidation GL1/GBP sur la TEM.

A. Etude du taux protéique de la E-Cadhérine et de la N-cadhérine dans les cellules A549c et DKO GL1/GBP non traitées ou traitées au TGFβ (5 ng/ml) et TNFα (20 ng/ml) pendant 24h. **B.** Etude du taux d'ARNm CDH1 et CDH2 dans les cellules A549c et DKO GL1/GBP (DKO I) non traitées ou traitées au TGFβ (5 ng/ml) et TNFα (20 ng/ml) pendant 24h. **C.** Analyse par Western blot de SNAIL dans les cellules A549c et A549 DKO GL1/GBP (DKO I). **D.** Analyse du taux d'ARNm SNAIL dans les cellules A549c et A549 DKO I non traitées ou induites en TEM par un traitement TGFβ (5 ng/ml) et TNFα (20 ng/ml) pendant 24h. **E.** Analyse du taux d'ARNm SNAIL en présence d'Actinomycine D 250 ng/ml pendant 0; 0,5; 0,75; 1; 2 et 4h par RT-qPCR. **F.** Analyse du taux protéique de SMAD2 et SMAD3 par Western blot dans les cellules A549c et DKO I en présence ou non de NH₄Cl 50 mM pendant 2h. **G.** Etude du taux d'ARNm de SMAD2 et SMAD3 par RT-qPCR dans les cellules A549c et DKO I non traitées. **H.** Etude de l'invasion des cellules A549c et A549 DKO I en chambre de Boyden tapissée de matrigel après 24h. Les cellules ont été marquées au crystal violet. La densité cellulaire a été estimée par photographie au microscope EvosXL Core. Les données d'au moins 3 expériences indépendantes sont présentées ±S.E.M. P* < 0,05 comparé aux cellules contrôles. Le test T de Student a été utilisé.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux de ma thèse a consisté en l'étude du rôle de la protéine GABARAPL1 dans l'autophagie et dans le cancer, deux mécanismes étroitement liés. Ces travaux ont permis d'étudier le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie et de déterminer l'implication de ces rôles dans le cancer et particulièrement lors de la TEM. Ces travaux ont permis de mieux caractériser et d'identifier les liens entre autophagie et cancer.

I. Protéines ATG8 et autophagie

La famille des protéines ATG8 comprend deux sous-familles GABARAP et LC3. Au cours de l'autophagie, ces protéines sont associées à la membrane des autophagosomes grâce à un mécanisme appelé lipidation. Les protéines ATG8 sont clivées en aval d'une glycine localisée en position C-terminale puis conjuguées à un phospholipide de la membrane de l'autophagosome. Une fois associées aux autophagosomes, les protéines ATG8-II et principalement les protéines LC3-II sont utilisées comme des marqueurs du flux autophagique en rendant compte à un instant t du nombre d'autophagosomes présents dans les cellules (Kabeya et al., 2004).

Initialement, les protéines ATG8 ont été décrites comme ayant un rôle dans l'autophagie et en particulier dans l'autophagie sélective grâce à leur localisation au niveau des autophagosomes (Pankiv et al., 2007). De plus, les protéines de la sous-famille LC3 ont été décrites comme impliquées dans l'élongation de la membrane du phagophore alors que les protéines GABARAP ont plutôt été décrites comme agissant lors des étapes plus tardives (Weidberg et al., 2010). Plus tard, d'autres études ont permis d'identifier que les protéines ATG8 étaient également impliquées dans l'assemblage de l'autophagosome (Alemu et al., 2012) et la courbure de la membrane (Knorr et al., 2014). Ce sont nos études ainsi que des études plus récentes qui ont mis en lumière le rôle différentiel des protéines ATG8 au cours de l'autophagie.

La glycine 116 de GABARAPL1 est nécessaire à sa lipidation

Notre étude dans les cellules de cancer du sein MCF-7 surexprimant le mutant GABARAPL1-G116A où la glycine 116 de GABARAPL1 est remplacée par une alanine, a permis de mettre en évidence que cette glycine 116 est nécessaire à la lipidation de GABARAPL1 et à son association au niveau des autophagosomes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude des mutants GABARAP-G116A, GABARAPL2-G116A et LC3-G120A où les mutations de leur glycine en C-terminal inhibent leur localisation au niveau des vésicules autophagiques (Kabeya et al., 2000, 2004; Tanida et al., 2003). Les études sur les mutants GABARAPs-G116A n'avaient pas pour objectif de mettre en évidence le rôle de ces mutants dans l'autophagie mais concernaient leur implication dans leurs interactions avec des récepteurs. En effet, la mutation GABARAP-G116A ne modifie pas son interaction avec le récepteur à l'angiotensine mais inhibe ses interactions avec le récepteur GABA_A et le récepteur aux κ -opioïdes. En

revanche, la mutation GABARAPL1-G116A ne modifie pas son interaction avec ce dernier (Alam et al., 2010; Chen and Olsen, 2007; Chen et al., 2011). De manière similaire, dans la **publication I** nous avons montré que la mutation GABARAPL1-G116A ne modifie pas l'interaction de GABARAPL1 avec la tubuline ni la dégradation de GABARAPL1 par le protéasome. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les protéines ATG8 possèdent des rôles indépendants de leur lipodation.

Les protéines de la sous-famille GABARAP ont des rôles redondants dans le flux autophagique basal et induit

Pour étudier le flux autophagique nous avons utilisé des modèles cellulaires MCF-7 surexprimant GABARAPL1 et des modèles A549 et ACHN KO GABARAPL1.

Premièrement, nous avons étudié le flux autophagique basal dans les cellules MCF-7 et avons montré que la surexpression de GABARAPL1 augmente le flux basal indépendamment de la localisation au niveau des autophagosomes (**Publication I**). Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats préalablement obtenus au laboratoire dans des cellules MDA-MB-436 où l'inactivation de GABARAPL1 par ShRNA conduit à une diminution du flux autophagique basal (Boyer-Guittaut et al., 2014). Toutefois, lors de l'étude du flux autophagique basal dans les cellules A549 et ACHN nous avons montré que l'inactivation de GABARAPL1 par CRISPR/Cas9 ne modifie pas le flux basal (**Publication II**).

Nous avons également étudié le flux autophagique induit et montré dans les cellules MCF-7 que la surexpression de GABARAPL1 permet une augmentation du flux autophagique induit dépendamment de sa localisation au niveau des autophagosomes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les cellules ACHN où l'inactivation de GABARAPL1 conduit à une inhibition du flux autophagique induit. En revanche, dans les cellules A549, l'inactivation de GABARAPL1 ne modifie pas le flux induit (Données non montrées).

La complexité des résultats obtenus sur le rôle de GABARAPL1 lors de l'autophagie basale et induite peut être expliquée premièrement par le fait que les modèles de surexpression sont des modèles peu physiologiques puisque le taux d'expression de GABARAPL1 est très élevé et n'existerait pas dans des cellules non modifiées. De plus, le rôle des protéines ATG8 dans le flux autophagique ne se limite pas au rôle de GABARAPL1. Tout d'abord, lors de l'inactivation des 6 membres de la famille ATG8, la réexpression individuelle de GABARAP, GABARAPL1 ou GABARAPL2, restaure le flux basal (Nguyen et al., 2016). De plus, l'inactivation de la sous-famille GABARAP conduit à une diminution du flux autophagique induit et lors de l'inactivation des 6 membres ATG8, la réexpression de n'importe quelle protéine ATG8, excepté LC3C, restaure le flux autophagique induit (Nguyen et al., 2016; Szalai et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les protéines ATG8 peuvent avoir une redondance fonctionnelle. Ainsi, la différence de l'implication de GABARAPL1 dans nos différents modèles cellulaires pourrait

rendre compte du taux d'expression de GABARAPL1 mais également du taux d'expression des autres membres de la sous-famille GABARAP ou des membres de la sous-famille LC3. Dans les cellules A549 où l'invalidation de GABARAPL1 ne modifie ni le flux autophagique basal ni induit (données non montrées), au niveau transcriptomique, nous avons montré une faible expression de GABARAPL1 et une forte expression de GABARAP et GABARAPL2. Ainsi dans ce modèle, les protéines GABARAP et GABARAPL2 pourraient suffire à assurer le flux autophagique basal et induit du fait de la compensation fonctionnelle des protéines de la sous-famille GABARAP. En revanche, dans les cellules ACHN où le flux autophagique induit est inhibé lors de l'invalidation de GABARAPL1 (données non montrées), les cellules expriment fortement GABARAPL1 mais n'expriment que faiblement GABARAP et GABARAPL2. Ainsi lors de l'invalidation de GABARAPL1, GABARAP et GABARAPL2 ne suffiraient pas à assurer l'autophagie dans les conditions d'induction. Ainsi le rôle de chacune des protéines de la sous-famille GABARAP pourrait être fonctionnellement compensé à condition d'une expression suffisante des autres membres pour assurer le flux autophagique basal et induit expliquant que l'invalidation de GABARAPL1 ait des effets différents en fonction des lignées cellulaires.

Notre hypothèse est également corroborée par les résultats obtenus dans les cellules A549 DKO GABARAPL1/GABARAP. En effet, la simple invalidation de GABARAPL1 ne modifie pas le flux autophagique alors que l'invalidation de GABARAP dans ces cellules inhibe le flux autophagique basal et induit témoignant de l'importance de GABARAP dans ces cellules. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de la double invalidation GABARAPL1/GABARAP sur le flux autophagique dans les cellules ACHN.

De manière similaires aux protéines GABARAP, les protéines LC3 ont été décrites comme ayant un rôle dans l'élongation du phagosome (Alemu et al., 2012). Pourtant, elles ont également été décrites comme n'étant pas impliquées dans le flux autophagique basal et induit dans un modèle HeLa. En effet, deux études ont montré que l'invalidation génétique de la sous-famille LC3 ne modifiait pas le flux autophagique basal et induit. Toutefois, lors de l'invalidation des deux sous-famille LC3 et GABARAP, le flux autophagique basal était inférieur que lors de l'invalidation uniquement de la sous-famille GABARAP suggérant malgré tout une faible implication des protéines LC3 dans le flux autophagique basal (Nguyen et al., 2016; Vaites et al., 2018). Ces résultats suggèrent que dans ces cellules, les acteurs majoritaires du flux autophagique sont les protéines de la sous-famille GABARAP.

Au cours de l'autophagie, GABARAPL1 possède plusieurs rôles dont la régulation des complexes d'initiation ainsi que la régulation des étapes de fusion autophagosome/lysosome. Bien que certaines études aient démontré que l'absence des protéines GABARAP puisse être compensée par les protéines LC3, *in cellulo*, les protéines GABARAP semblent majoritairement impliquées dans la régulation de la majeure partie des étapes de l'autophagie.

GABARAPL1 active les complexes d'initiation de l'autophagie (Figure 20)

Lors des étapes précoces de l'autophagie, plusieurs complexes d'initiation interviennent. Tout d'abord, le complexe ULK1 composé de ULK1, FIP200, ATG13 et ATG101, est recruté au niveau du phagophore naissant, puis il permet l'activation du complexe PI3KC3-C1 composé de VPS34, BECLIN1, ATG14L, p150 et PI3K permettant de générer du PI3P (phosphatidylinositol-3 phosphate). Ce PI3P permet le recrutement des protéines WIPI2 qui elle-même recrutent le complexe ATG16L1. Enfin, ce dernier recrute les protéines ATG8 qui ont déjà été clivées par ATG4 afin qu'elles soient associées à un phospholipide de la membrane de l'autophagosome permettant l'élongation du phagophore.

Au cours de ces étapes précoces, il a été décrit que les protéines ATG8, et en particulier les protéines GABARAP et GABARAPL1 sont capables d'interagir avec les protéines ULK1, ATG13 et FIP200 (Alemu et al., 2012)(Figure 20, ②). Toutefois, comme nous venons de le décrire, de manière chronologique, ULK1 est relocalisé au niveau du phagophore avant les protéines ATG8 (Itakura and Mizushima, 2010). Ainsi, les interactions entre les protéines GABARAP et ULK1 permettraient le recrutement et l'activation d'autres complexes ULK1 au niveau du phagophore naissant nécessaires à l'élongation du phagophore (Joachim and Tooze, 2018). En effet, GABARAP permet l'activation de ULK1 (Joachim et al., 2015, 2017) et nous avons également montré dans la **Publication I**, que la surexpression de GABARAPL1 conduit à une augmentation de la phosphorylation activatrice (Ser555) de ULK1 et une diminution de sa phosphorylation inhibitrice (Ser757). Toutefois, de manière surprenante, la surexpression du mutant GABARAPL1-G116A, comme la surexpression de GABARAPL1 conduit également à une augmentation de l'activation de ULK1 suggérant que ULK1 puisse être activé dans le cytoplasme par les protéines GABARAP avant d'être recruté au niveau du phagophore. En effet, il a été décrit que GABARAP non lipidé peut être localisé au niveau péricentriolaire impliquant que les protéines GABARAP interagissent avec ULK1 à ce niveau et que les complexes GABARAPs-ULK1 soient ensuite recrutés par le complexe ATG16L1 au niveau du phagophore pour maintenir son élongation. De plus, ATG4D permettant le clivage de GABARAPL1 induisant sa lipodation, a également été décrit comme localisé au niveau péricentriolaire suggérant que GABARAPL1 puisse également activer ULK1 à cet endroit et que le complexe GABARAPL1-ULK1 soit recruté par ATG16L1. De plus, l'interaction GABARAP-ULK1 n'est pas régulée par une carence en acides aminés. Ainsi, ces interactions seraient uniquement impliquées dans l'autophagie basale et lors d'une carence en nutriments l'induction de l'autophagie passerait par un mécanisme indépendant de la régulation de ULK1 par les protéines ATG8 (Itakura and Mizushima, 2010; Joachim et al., 2015, 2017). Ces résultats peuvent expliquer que la double invalidation de GABARAPL1/GABARAP dans les cellules A549 inhibe le flux autophagique.

Ainsi, les protéines GABARAP pourraient d'une part lier et activer ULK1 au niveau centriolaire puis les complexes GABARAPs-ULK1 seraient recrutés *via* ATG16L1 au niveau du phagophore

permettant l'élongation du phagophore. D'autre part, les interactions GABARAPs-ULK1 pourraient permettre de stabiliser les complexes protéiques d'initiation afin de maintenir l'élongation.

De plus, le complexe ULK1 est impliqué dans la régulation de l'initiation de l'autophagie par son rôle dans la phosphorylation inhibitrice de Raptor, un membre du complexe MTORC1. Ainsi, l'activation de ULK1 par les protéines GABARAP permettrait de maintenir l'inactivation de MTORC1 conduisant à une boucle de rétrocontrôle positive de l'autophagie (Dunlop and Tee, 2014) indépendamment de la lipudation des protéines GABARAP permettant une augmentation du flux autophagique basal.

De manière similaire, il a été montré au sein du laboratoire que GABARAPL1 pouvait interagir avec AMPK (Données non publiées)(Figure 20, ①), impliquée également dans la régulation de l'autophagie. Ainsi GABARAPL1 pourrait permettre l'activation de AMPK conduisant à l'inhibition de MTORC1 également par la phosphorylation de Raptor conduisant à l'activation de l'autophagie. Il serait ainsi intéressant de vérifier que la mutation G116A de GABARAPL1 n'inhibe pas son interaction avec AMPK.

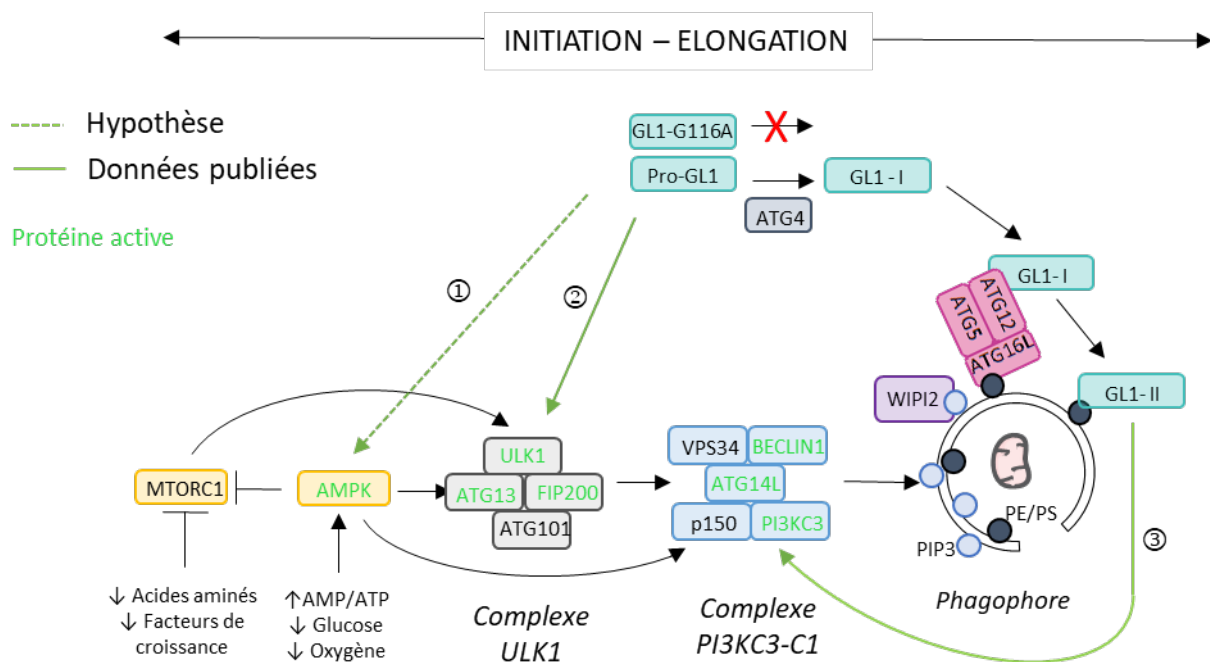


Figure 20 : Rôle de GABARAPL1 dans l'initiation de l'autophagie et l'élongation du phagophore.

① GABARAPL1 peut interagir avec AMPK et pourrait permettre l'activation de AMPK. ② GABARAPL1 et GABARAP peuvent interagir avec ULK1, ATG13 et FIP200 conduisant à l'activation du complexe ULK1. GABARAPL1 peut activer ULK1 de manière indépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes. ③ GABARAPL1 et GABARAP peuvent interagir avec PI3KC3, BECLIN1 et ATG14L conduisant à l'activation du complexe PI3KC3-C1.

Enfin, récemment, un autre mécanisme impliquant les protéines ATG8, et particulièrement les protéines de la sous-famille GABARAP dans les étapes précoces de l'autophagie, a été décrit. En effet, les protéines ATG8 peuvent interagir avec les protéines PI3KC3, BECLIN1 et ATG14 du complexe PI3KC3-C1 (Figure 20, ③). Ces interactions impliqueraient préférentiellement les protéines GABARAP et GABARAPL1 plutôt que les protéines LC3. Ces interactions ont été décrites comme permettant la

localisation de ATG14L au niveau des autophagosomes et comme induisant la phosphorylation de ATG14 médiée par ULK1 permettant l'activation du complexe PI3KC3-C1 induisant l'autophagie (Birgisdottir et al., 2019). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle important de GABARAPL1, mais également de GABARAP, dans l'initiation de l'autophagie. Ainsi, les protéines ATG8 pourraient permettre le recrutement du complexe PI3KC3-C1 au niveau du phagophore à proximité de ULK1 induisant son activation par la phosphorylation de ATG14L médiée par ULK1.

GABARAPL1 régule les étapes tardives de l'autophagie dépendamment de sa localisation au niveau des autophagosomes (Figure 21)

Lors des étapes tardives de l'autophagie, l'autophagosome fusionne avec un lysosome permettant la dégradation de son contenu. Nous avons montré que la surexpression de GABARAPL1 conduit à une augmentation de la fusion autophagosome/lysosome et que ce rôle est dépendant de sa localisation au niveau des autophagosomes.

Le rôle de GABARAPL1 dans les étapes tardives a été préalablement décrit au sein du laboratoire comme impliquant une régulation du nombre de lysosomes (Boyer-Guittaut et al., 2014). De plus, il a été récemment décrit que les protéines ATG8 sont impliquées dans la biogenèse des lysosomes et des autolysosomes. En effet, les protéines ATG8 sont impliquées dans la relocalisation des protéines STX16 au niveau du lysosome (Figure 21, ③) via leur motif LIR qui est important pour la régulation de l'activité des lysosomes (Gu et al., 2019). Ainsi, une augmentation du nombre de lysosomes disponibles pourrait permettre une augmentation de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. De plus, GABARAPL1 a été décrit comme étant capable d'interagir avec les microtubules et d'augmenter leur polymérisation de manière indépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes (Figure 21, ①).

Plus récemment, il a été décrit que le rôle des protéines GABARAP et GABARAPL1 au cours des événements de fusion impliquerait leurs rôles dans le recrutement des facteurs de fusion au niveau des autophagosomes expliquant ainsi l'importance de leur localisation au niveau des autophagosomes. Initialement, il a été décrit que les protéines ATG8 et préférentiellement les protéines GABARAP et GABARAPL1, permettent le recrutement des protéines PLEKHM1 (Figure 20, ④) localisées dans la membrane lysosomale et PI4KII α (Figure 21, ②) permettant de générer du PI3P au niveau des autophagosomes facilitant les événements de fusion (McEwan and Dikic, 2015; Wang et al., 2015). De manière similaire, les protéines GABARAP et GABARAPL1 ont également été décrites comme permettant le recrutement de BRUCE (Figure 21, ④), une autre protéine lysosomale, induisant également les événements de fusion autophagosome/lysosome (Ebner et al., 2018).

← RELOCALISATION AUTOPHAGOSOMES – FUSION AVEC LYSOSOMES →

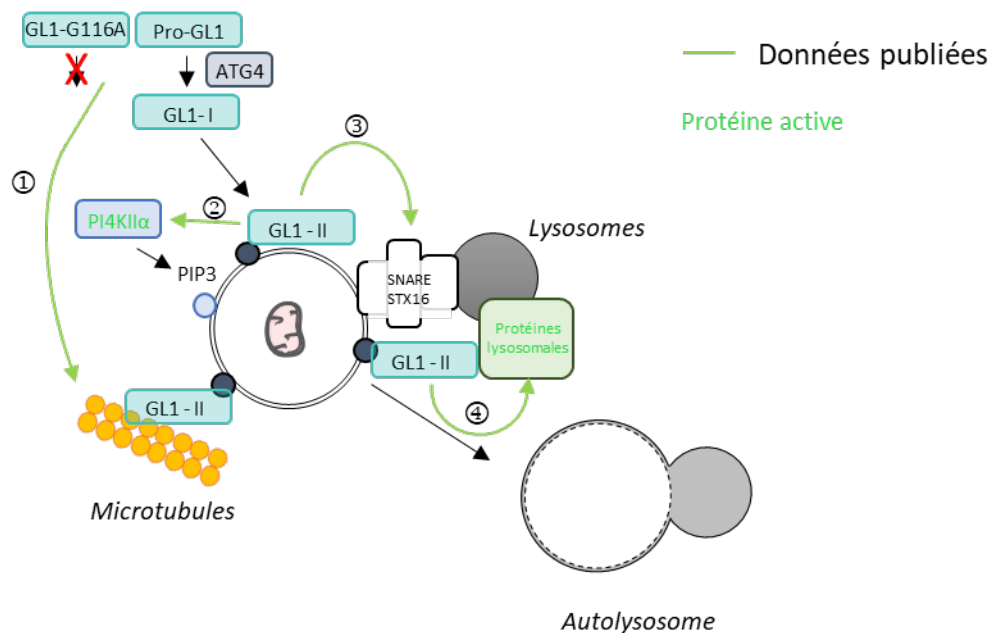


Figure 21 : Rôle de GABARAPL1 dans la relocalisation des autophagosomes et lors de leur fusion avec un lysosome.

① GABARAPL1 augmente la polymérisation des microtubules indépendamment de sa localisation au niveau des autophagosomes ce qui pourrait favoriser la relocalisation des autophagosomes. ② GABARAPL1 et GABARAP permettent le recrutement de PI4KIIα permettant de générer du PIP3. GABARAPL1 et GABARAP permettent le recrutement ③ de STX16 impliquée dans le complexe SNARE et ④ de protéines lysosomales telles que PLEKHM1 et BRUCE permettant la mise en place de ponts protéiques entre l'autophagosome et le lysosome induisant la fusion autophagosome/lysosome

Pour conclure, le rôle des protéines ATG8 au cours de l'autophagie sont multiples. Tout d'abord, les protéines GABARAP permettraient la régulation de l'autophagie basale par la régulation des étapes précoces grâce à l'activation du complexe ULK1 et PI3KC3-C1. En revanche, le rôle des protéines LC3 dans l'initiation serait opposé. En effet, les protéines LC3 ont quant à elles été décrites comme inhibant ULK1 (Grunwald et al., 2019). Ainsi les protéines LC3 pourraient empêcher l'emballement de l'induction de l'autophagie qui conduirait à la mort cellulaire. Enfin, lors des étapes plus tardives, les protéines ATG8 et en particulier les protéines GABARAP sont impliquées dans la mise en place de ponts protéiques entre l'autophagosome et le lysosome permettant leur fusion. Les étapes d'induction de l'autophagie et de fusion seraient ainsi régulées par les protéines GABARAP. Concernant le rôle des protéines LC3 dans les étapes tardives de l'autophagie, leurs rôles seraient différents du rôle des protéines GABARAP puisqu'elles ont été plutôt décrites comme permettant le transport des autophagosomes vers les lysosomes. En effet, la microinjection d'anticorps anti-LC3 inhibe la relocalisation des autophagosomes (Kimura et al., 2008). Le rôle des protéines LC3 dans ces transports implique des interactions entre les protéines LC3 et la tubuline de manière directe ou indirecte par le biais d'interactions avec des moteurs moléculaires (Fu et al., 2014; Pankiv et al., 2010). En revanche, le rôle des protéines GABARAP dans ces transports n'a à ce jour pas été étudié. Toutefois, GABARAPL1 peut interagir avec la tubuline et peut

augmenter sa polymérisation (Mansuy et al., 2004). De ce fait, des études sur le rôle des protéines GABARAP dans ces transports pourraient être intéressantes.

Le rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie impliquerait donc l'activation de protéines clefs régulant l'induction de l'autophagie mais également un recrutement sélectif de protéines au niveau des autophagosomes conduisant à l'élongation du phagophore puis à la fusion de l'autophagosome et du lysosome. Ces recrutements par les protéines ATG8 localisées à l'intérieur de l'autophagosome permettrait leur dégradation par autophagie sélective alors que celui réalisé par les protéines ATG8 localisées à l'extérieur permettrait le recrutement des acteurs indispensables à l'autophagie.

II. ATG8, cancer et TEM

La carcinogénèse consiste en la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse par l'accumulation de mutations au niveau de proto-oncogènes conduisant à une prolifération accrue des cellules aboutissant à la formation d'une tumeur primaire. Puis, les cellules de la tumeur primaire peuvent devenir agressives par l'acquisition de capacités de mobilité, de capacité accrue d'auto-renouvellement ou encore de résistance aux traitements impliquant la TEM.

Autophagie & cancer

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les rôles de l'autophagie au cours de la carcinogénèse sont multiples. Tout d'abord, l'autophagie aurait un rôle anti-tumoral lors des stades précoces de la carcinogénèse (transformation cellulaire, progression tumorale). En effet, l'autophagie permet l'élimination des ERO, des rétrotransposons ARN et des oncoprotéines (Belaid et al., 2013; Goussetis et al., 2012; Guang et al., 2019; Guo et al., 2014). L'autophagie permet également l'apoptose et la sénescence induite par l'oncogène Braf ou encore la mort par autophagie (Elgendy et al., 2011; Liu et al., 2013a).

Lors des stades plus tardifs, l'autophagie aurait un rôle plutôt pro-tumoral. Une fois la tumeur primaire établie, les cellules sont soumises aux conditions du microenvironnement tumoral généralement hypoxique et carencée en nutriments avant la vascularisation de la tumeur. Dans ces conditions de stress, l'autophagie permet le maintien du métabolisme cellulaire des cellules cancéreuses (Weinberg et al., 2010; Yang et al., 2011). L'autophagie permet également *via* la mitophagie le maintien de la qualité mitochondriale nécessaire pour la production d'ATP par les oxydations phosphorylantes réduisant ainsi la source de ERO et donc le stress oxydatif (Singh et al., 2009). De plus, les cellules cancéreuses sont soumises à la sécrétion de cytokines telles que le TGF β par les cellules du système immunitaire et du microenvironnement tumoral conduisant à l'induction de la TEM. Au cours

de la TEM, comme nous l'avons précédemment détaillé dans l'introduction, le rôle de l'autophagie est complexe et sera discuté dans la sous-partie Rôles de GABARAPL1 dans l'agressivité tumorale et la TEM.

Expression des ATG8 dans le cancer

L'expression des ATG8 dans les cancers est complexe et reste peu décrite à ce jour (**Revue I**). Toutefois, les études actuelles ont permis de mettre en évidence que l'expression des membres de la sous-famille GABARAP était généralement diminuée dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. La forte expression des GABARAPs est liée à un bon pronostic dans de nombreux cancers (pancréas, neuroblastome, rein et foie)(Brigger et al., 2013b; Hervouet et al., 2015; Liu et al., 2014; Roberts et al., 2004; Uhlen et al., 2017). La diminution de l'expression des membres de la famille ATG8 a été décrite comme liée à des modifications épigénétiques. En effet, la diminution de l'expression de GABARAPL1 est due à une augmentation de la méthylation de son promoteur et à la désacétylation de l'histone H3 conduisant à la condensation de la chromatine dans les cellules MCF-7 (Hervouet et al., 2015). De plus, dans les cellules HeLa l'expression de GABARAPL1, GABARAPL2 et LC3 est réprimée par la méthyltransférase G9a (Artal-Martinez de Narvajás et al., 2013). Puis, la diminution de l'expression des ATG8 a également été décrite comme étant liée à une activation constitutive de voies de signalisation. En effet, l'activation de la voie Akt et l'inactivation des facteurs de transcription FoxO conduisent à une diminution de l'expression de GABARAPL1 dans le cas de cellules de cancer de la prostate (Su et al., 2016).

Pourtant dans le cas d'adénocarcinome de poumon, nous avons montré dans la **Publication II** que l'expression de GABARAPL1 est corrélée avec l'expression de marqueurs mésenchymateux (marqueurs également d'agressivité) au niveau transcriptomique et également que le taux protéique de GABARAPL1 est augmenté dans des tumeurs d'adénocarcinomes mésenchymateux (TEM+) par rapport aux tumeurs épithéliales (TEM-). Toutefois, nous n'avons pas les informations concernant le taux de GABARAPL1 entre les adénocarcinomes et le tissu sain chez ces patients.

Les modulations de l'expression des ATG8 dans la carcinogenèse peuvent également dépendre du taux d'expression initial de ces gènes. En effet, nous avons montré dans la **Publication II** que le taux basal des différents gènes ATG8 est différent en fonction des lignées cellulaires. Les cellules d'adénocarcinomes de rein provenant d'un site métastatique ACHN ont une forte expression basale de GABARAPL1 et cette expression ne peut donc pas être augmentée lors de l'induction de la TEM. En revanche, les cellules non tumorales transformées MCF10A et d'adénocarcinome de poumon A549 ont une plus faible expression basale de GABARAPL1, ainsi, l'expression de GABARAPL1 peut être induite et est augmentée lors de l'induction de la TEM. De plus, l'expression de GABARAPL1 pourrait également dépendre du stade de la tumeur tel qu'il a été décrit dans le cadre d'une cohorte de cancer du sein où

l'expression de GABARAPL1 diminue avec l'avancement de la progression tumorale (Hervouet et al., 2015).

Ces résultats suggèrent que l'expression de GABARAPL1 dans la carcinogenèse pourrait dépendre du type de tumeur. En effet, l'expression de GABARAPL1 mais également des autres membres de la famille ATG8 a également été décrite comme parfois augmentée dans les cancers (cancer du sein triple négatif et cancer de la tête et du cou)(Keulers et al., 2015; Ran et al., 2017). Toutefois, l'expression des ATG8 est couramment utilisée comme marqueur du flux autophagique. Ainsi, une diminution de l'expression des ATG8 peut rendre compte d'une diminution du flux autophagique dans les cellules cancéreuses suggérant que le taux d'expression des ATG8 soit uniquement une observation corrélative au flux autophagique de ces cellules cancéreuses.

Au vu des liens étroits entre autophagie et cancer et de l'expression des ATG8 et en particulier de GABARAPL1 dans les cancers, nous avons voulu étudier l'implication de ces protéines lors de la carcinogenèse. Comme nous l'avons décrit précédemment, le rôle de l'autophagie au cours de la carcinogenèse serait dépendant du stade du cancer et du type de tumeur. Lors de l'étude du rôle des protéines ATG8 et en particulier de GABARAPL1 dans le cancer, nous avons pu mettre en évidence un rôle plutôt anti-tumoral. Initialement, les protéines ATG8 ont été décrites comme étant supprimeur de tumeur par leur implication dans la dégradation sélective d'oncogènes cellulaires. Nous nous sommes donc demandé si ces protéines pouvaient également avoir un rôle indépendant de leur localisation au niveau des autophagosomes et donc de l'autophagie sélective. Pour cela, nous avons désigné un mutant GABARAPL1-G116A où la glycine 116 nécessaire à la lipidation de GABARAPL1 a été remplacée par une alanine inhibant son association dans les vésicules autophagiques. Les protéines ATG8 ont également été décrites comme permettant la régulation de l'autophagie, ainsi leur rôle dans le cancer pourrait rendre compte de leur rôle dans l'autophagie et du rôle de l'autophagie dans le cancer.

Rôle des protéines ATG8 dans le cancer dépendant et indépendant de leur lipidation et de leur rôle dans l'autophagie

Tout d'abord, nous avons montré dans la **Publications I** que la surexpression de GABARAPL1 inhibe la clonogénéité, la prolifération indépendante de l'ancrage, l'invasion ainsi que l'adhérence cellulaire de manière dépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes dans les cellules MCF-7. En revanche, nous avons montré que GABARAPL1 inhibe la migration de manière indépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes. Et de manière surprenante, nous avons montré que GABARAPL1 inhibe la prolifération de manière dépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes dans les cellules MCF-7 mais de manière indépendante dans les cellules BT474. Ainsi, les rôles de GABARAPL1 dans la carcinogenèse sont complexes.

D'une part, GABARAPL1 pourrait inhiber la carcinogenèse de manière dépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes par son implication dans la dégradation sélective de protéines oncogéniques ou d'organites non fonctionnelles. En effet, les protéines ATG8 ont été décrites comme permettant la dégradation sélective de NIX, de mitochondries et de p62 (Boyer-Guittaut et al., 2014; Islam et al., 2018). Ainsi, un défaut de la dégradation de NIX ou des mitochondries conduit à une accumulation de mitochondries endommagées augmentant ainsi le niveau cellulaire de ERO eux-mêmes impliqués dans la réorganisation du cytosquelette et dans l'agressivité tumorale. De plus, il a été décrit dans différents cancers (foie, gastrique, sein prostate) que l'altération de la dégradation de p62 est impliquée dans la dérégulation du métabolisme de glucose induisant la carcinogenèse (Rodger et al., 2018; Schwarten et al., 2009; Takamura et al., 2011). De manière similaire, les protéines GABARAP et GABARAPL1 ont été décrites comme impliquées dans la dégradation de Dvl2 conduisant à une inhibition de la voie Wnt inhibant la croissance tumorale dans le cas du cancer du foie (Zhang et al., 2011). La protéine LC3B a également été décrite comme permettant la dégradation sélective de la Lamine B1 conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire et une induction de la sénescence. Les protéines GABARAPs peuvent également interagir avec la Lamine B1 et pourraient également permettre cette dégradation (Dou et al., 2015; Shimi et al., 2011). De plus, les protéines ATG8 sont également impliquées dans la dégradation par autophagie de type LAP (Mansuy et al., 2004; Winer et al., 2018) permettant la dégradation de récepteurs membranaires et également dans le transports de ces récepteurs régulant ainsi leur nombre à la membrane. Cette régulation du nombre de récepteurs à la membrane plasmique peut également contribuer à l'activation différentielle de voie de signalisation régulant la prolifération (Takehara et al., 2007).

D'autre part, nous avons montré que la protéine GABARAPL1 peut inhiber la carcinogenèse indépendamment de sa localisation au niveau des autophagosomes et donc de manière indépendante de son rôle dans l'autophagie sélective. En effet, la surexpression de GABARAPL1 ou de GABARAPL1-G116A conduit à une inhibition de la croissance tumorale *in vivo*. Toutefois, les mécanismes moléculaires ne sont pas encore compris. Cependant, les protéines ATG8 permettent la régulation d'importants acteurs de la carcinogenèse tel que MTOR (Laplanche and Sabatini, 2012). De plus, il a également été montré que GABARAP permet l'arrêt du cycle cellulaire en augmentant l'expression de p53 conduisant à une diminution de la viabilité, de la migration et de la prolifération dans le cas de cancer du sein et de l'ovaire (Rho et al., 2013). GABARAP inhibe également la voie de signalisation PI3K/Akt conduisant à une diminution de la prolifération et de l'angiogenèse tumorale dans le cas du cancer de l'ovaire (Park et al., 2014).

Les rôles des protéines ATG8 dans la carcinogenèse indépendants de leur localisation au niveau des autophagosomes ne sont pas nécessairement indépendants de l'autophagie puisque GABARAPL1

permet l'activation de l'initiation de l'autophagie indépendamment de sa lipidation. Ainsi, l'activation de l'autophagie permettrait l'apport en énergie nécessaire au maintien de la prolifération cellulaire (White et al., 2015).

Rôles de GABARAPL1 dans l'agressivité tumorale et la TEM

Comme nous l'avons décrit précédemment, un mécanisme impliqué dans l'augmentation de l'agressivité tumorale est la TEM. L'autophagie est impliquée dans la régulation de la TEM avec un rôle complexe et dépendant du type de tumeur. D'une part, l'autophagie aurait un rôle anti-TEM en dégradant certains inducteurs de la TEM tel que les ERO et permet également la dégradation des facteurs de transcription impliqués dans cette voie (SNAI1 et TWIST) inhibant ainsi la TEM (Catalano et al., 2015; Grassi et al., 2015; Lv et al., 2012). En revanche, l'autophagie aurait également un rôle pro-TEM en permettant la survie des cellules indépendamment de l'ancrage, la réorganisation du réseau mitochondrial, la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive de la production du TGF β , la dégradation de la E-Cadhérine ou encore la dégradation du facteur de transcription HIF-1 α (Fung et al., 2008; Gugnoni et al., 2017; Pang et al., 2016; Tong et al., 2018; Zhu et al., 2014).

Dans la **Publication II**, nous avons montré que l'inactivation de GABARAPL1 conduit à un engagement des cellules A549 et ACHN en TEM *via* la régulation des gènes de la TEM au niveau transcriptionnel. L'augmentation de l'expression de la N-Cadhérine, protéine impliquée dans la mobilité cellulaire dans les cellules KO GABARAPL1 et la diminution de l'expression de la E-Cadhérine, protéine impliquée dans les jonctions cellule-cellule expliquent l'augmentation du caractère invasif de ces cellules (Brabletz et al., 2018; Haynes et al., 2011). Lors de l'induction de la TEM, les cellules adoptent un phénotype de type fibroblastique (Brabletz et al., 2018). Dans notre étude, les cellules A549 KO GABARAPL1 et ACHN KO GABARAPL1 ne semblent pas morphologiquement différentes des cellules contrôles en microscopie optique classique. Cependant, nous avons tout de même mis en évidence que les cellules A549 KO GABARAPL1 ont une aire cellulaire légèrement plus grande que les cellules contrôles suggérant un engagement de ces cellules en TEM.

Nos observations sur le rôle de GABARAPL1 dans la régulation de la TEM sont en accord avec de précédentes études qui ont permis de mettre en évidence que l'autophagie permet la dégradation des EMT-TFs SNAI1 et TWIST. De plus, SNAIL et TWIST peuvent être localisés dans les autophagosomes et interagir avec p62. Il a également été montré que SNAIL peut également directement interagir avec LC3 *via* les LIR présents dans SNAI1. Ces résultats suggèrent que la dégradation de SNAIL et TWIST fasse intervenir l'autophagie de type sélective (Catalano et al., 2015; Grassi et al., 2015; Lv et al., 2012; Zada et al., 2019). Dans la **Publication II**, nous avons montré que dans les cellules A549, TWIST et ZEB ne sont peu ou pas régulés lors de l'induction de la TEM alors que l'expression de *SNAI1* est fortement

augmentée suggérant une implication majeure de SNAI1 dans la régulation de la TEM dans ces cellules. En revanche, nous avons confirmé que l'autophagie permet la dégradation de SNAIL dans les cellules A549 et que cette dégradation est indépendante de GABARAPL1. De plus, nous avons montré que GABARAPL1 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle SNAI1. En effet, GABARAPL1 est impliquée dans la régulation de la voie SMAD alors que GABARAP ne semble pas être impliquée dans la régulation de cette voie.

Le rôle de GABARAPL1 dans la régulation de la voie SMAD impliquerait une dégradation de ces protéines par autophagie sélective médiée par GABARAPL1. En effet, dans les cellules A549c, SMAD2 et SMAD3 sont dégradées par autophagie et dans les cellules ACHNc, SMAD4 est dégradée par autophagie. En revanche, en absence de GABARAPL1, ces protéines ne semblent plus être dégradées par autophagie. Ainsi, une augmentation du taux total des protéines SMAD peut également augmenter le taux nucléaire de ces protéines et ainsi leur fixation sur les promoteurs des gènes cibles. En effet, une première expérience d'étude de la translocation nucléaire de SMAD2 et SMAD3 par immunofluorescence montre qu'il y a plus de SMAD2 et SMAD3 dans les noyaux des cellules KO GABARAPL1 que dans les cellules A549c (données non montrées). Ces résultats sont à confirmer et il serait également intéressant de regarder la translocation nucléaire de p-SMAD3 afin de vérifier l'activation des voies impliquant SMAD3.

La dégradation de protéines par autophagie sélective *via* les protéines ATG8 fait intervenir un motif appelé AIM (ATG8 interacting motif) permettant l'interaction directe ou indirecte entre la protéine ATG8 et la protéine à dégrader. Dans le cas d'une interaction indirecte, mettant en jeu un adaptateur comme p62, il a été montré que p62 interagit avec la protéine cible ubiquitinylée *via* son domaine UBA et que p62 interagit avec les protéines ATG8 par son domaine AIM suggérant qu'une interaction SMAD4-p62, TWIST-p62 ou SNAI1-p62 témoigne d'une dégradation par autophagie sélective de ces acteurs de la TEM. De plus, il a été décrit que SNAI1 peut être dégradée par autophagie sélective par une interaction directe avec LC3 ou indirecte *via* p62 (Zada et al., 2019).

Ces motifs AIM ont été décrits comme composés de 4 acides aminés W-X₁-X₂-V, W-X₁-X₂-L ou encore Y-X₁-X₂-L (Birgisdottir et al., 2013). De manière très récente, un motif d'interaction a été spécifiquement décrit pour les protéines GABARAP appelé GIM (GABARAP interacting motif) celui-ci ne diffère que peu du motif AIM préalablement décrit puisqu'il est également composé de 4 acides aminés et la séquence est la suivante W/F-V/I-X₂-V. Seul le premier acide aminé peut être différent du AIM et X₁ n'est pas un acide aminé au hasard mais serait une valine ou une isoleucine (Rogov et al., 2017). Nous avons alors étudié la présence de ces motifs dans les protéines SMAD. D'après la base de données iLIR Database, SMAD2 et SMAD3 possèdent 7 séquences de type AIM et la protéine SMAD4 possède 8 séquences de type AIM. Seules les séquences AIM ayant un score PSSM > 10 et localisées dans une région intrinsèquement désordonnée de la protéine ont 70% de chance d'être un LIR fonctionnel.

Aucune des protéines SMAD2, SMAD3 et SMAD4 ne réunit les deux conditions. Cependant, dans SMAD2 et SMAD3 deux motifs LIR possèdent un score PSSM > 10 et SMAD4 possède deux LIR avec un ayant un score PSSM > 10 et un autre LIR localisé dans une région désordonnée de la protéine (Jacomin et al., 2016). Des expériences de co-immunoprécipitation permettront de mettre en évidence une dégradation sélective des protéines SMAD *via* GABARAPL1.

Nos résultats sont en accord avec de précédentes études suggérant que SMAD4 pourrait être dégradé par autophagie sélective puisque SMAD4 interagit avec p62 *via* le domaine UBA (Ubiquitin binding domain) de p62. Toutefois, dans cette étude, ils ne montrent pas que SMAD4 serait dégradée par autophagie mais que lors de l'induction de la TEM, p62 augmente transcriptionnellement et permet de stabiliser SMAD4 augmentant ainsi l'expression de SNAI1 (Bertrand et al., 2015).

Ainsi, l'autophagie permettrait la régulation de la TEM à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'autophagie peut dégrader des inducteurs de la TEM tel que le TGF β (Ding et al., 2014) ou encore EMT-TFs tels que TWIST, l'autophagie sélective médiée par LC3 permet la dégradation de SNAI1, puis, l'autophagie sélective médiée par GABARAPL1 permettrait la dégradation des protéines SMAD. Nous avons suggéré que la dégradation des protéines SMAD pourrait être une boucle de rétrocontrôle. En effet, l'induction de la TEM permettrait l'induction de l'expression de GABARAPL1 qui permettrait la dégradation des SMAD inhibant ainsi la TEM. La régulation de la TEM par autophagie pourrait également impliquer la mise en place de boucles de rétrocontrôle positives. En effet, une augmentation du taux des protéines SMAD conduit à une diminution de la E-Cadhérine et il a été montré que la diminution de la E-Cadhérine conduit au relargage de la β -caténine et sa translocation dans le noyau. Ainsi, la β -caténine va intervenir comme facteur de transcription et par son interaction avec les protéines SMAD2 conduire à la régulation de gènes impliqués dans la TEM (Pang et al., 2016) permettant ainsi le maintien de l'induction de la TEM. Toutefois, dans les cellules A549, l'inactivation de GABARAPL1 diminue le taux de E-Cadhérine mais ne modifie pas le taux protéique total de la β -caténine (Données non montrées). Il serait donc intéressant d'étudier la translocation nucléaire de la β -caténine pour étudier si cette boucle de rétrocontrôle est mise en jeu dans les cellules A549. Cependant, il a également été décrit que l'autophagie sélective médiée par les protéines LC3 permet la dégradation de la β -caténine suggérant que cette boucle de rétrocontrôle positive soit également négativement régulée par l'autophagie (Petherick et al., 2013). Une autre boucle de rétrocontrôle positive pourrait également permettre le maintien de la TEM. En effet, SNAI1 peut former un complexe protéique avec p-SMAD3 et SMAD4 permettant la répression des gènes cibles de la TEM tels que *E-Cadhérine/CDH1* (Vincent et al., 2009) ainsi une augmentation des protéines SMAD conduit à une augmentation de SNAI1 aboutissant à une augmentation de la TEM.

De manière contradictoire, l'interaction entre des acteurs de la TEM et les protéines ATG8 pourrait également être à l'origine de l'inhibition de l'autophagie et à une augmentation de la TEM. En effet, il a été décrit dans un modèle de cancer de la thyroïde que le TGF β induit l'expression de CDH6 (Cadhérine 6) conduisant à l'acquisition de propriétés mésenchymateuses. CDH6 a été décrite comme pouvant interagir avec les protéines BNIP3 et BNIP3L mais également avec les protéines GABARAP et GABARAPL2 ce qui conduirait à l'inhibition de l'autophagie impliquée dans la fission du réseau mitochondrial permettant de subvenir aux besoins énergétiques lors de la mise en place de structures de mouvements et ainsi augmenter la TEM (Gugnoni et al., 2017).

Rôle de GABARAPL1 dans la formation des métastases in vivo

La formation des métastases est un processus multi-étape : invasion locale des cellules cancéreuses de la tumeur primaire, extravasation, survie dans la circulation sanguine, extravasation et survie dans le tissu secondaire. Toutes ces étapes peuvent être régulées par l'autophagie. Premièrement, comme nous l'avons décrit précédemment, l'autophagie est impliquée dans l'invasion des cellules de la tumeur primaire et l'extravasation par son implication dans la régulation de la TEM. Puis, l'autophagie permet aux cellules tumorales de survivre lors de leur détachement de la matrice (résistance à l'anoïkis) lors de leur transport par la circulation sanguine. L'autophagie est également impliquée dans l'extravasation, toujours par son implication dans la régulation de la TEM. Et enfin, l'autophagie permet l'adaptation des cellules métastatiques au nouveau microenvironnement (Mowers et al., 2017).

Étant donné l'implication de la TEM dans la formation des métastases et le rôle de GABARAPL1 dans la régulation de la TEM, nous avons étudié le rôle de GABARAPL1 dans la formation des métastases *in vivo*. Malgré l'engagement en TEM des cellules KO GABARAPL1, les deux expériences d'étude de la formation des métastases réalisées, semblent montrer que les souris ayant reçu les cellules A549 KO GABARAPL1 forment moins de métastases que les souris ayant reçu les cellules contrôles. Cependant, ces résultats surprenants nécessitent confirmation.

Le rôle de la TEM dans la formation des métastases est tout de même un sujet qui reste en débat puisque deux publications majeures ont mis en évidence que la TEM ne serait pas impliquée dans la formation des métastases mais plutôt dans la résistance aux traitements ou encore dans l'échappement des cellules en TEM au système immunitaire (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015). De plus, comme nous l'avons déjà décrit, la formation des métastases est un processus multi-étape et la TEM serait nécessaire à l'initiation de la formation des métastases. Toutefois, afin de permettre l'établissement de tumeurs secondaires, les cellules doivent subir la transition inverse appelée transition mésenchymato-épithéliale (TME) permettant ainsi aux cellules métastatiques de s'installer

dans le tissu secondaire et de former de nouveaux foyers (Tsai et al., 2012). Lors de notre étude sur la formation des métastases *in vivo*, les cellules ont été directement injectées dans la circulation sanguine. Ainsi, les étapes de croissance tumorale et de détachement des cellules de la tumeur primaire pour rejoindre la circulation sanguine ne sont pas étudiées ici et le rôle de GABARAPL1 dans l'établissement de tumeurs secondaires n'est à ce jour pas élucidé. De plus, le rôle des protéines ATG8 dans la formation des métastases pourrait impliquer des mécanismes indépendants de la dégradation d'acteurs par autophagie sélective. En effet, il a été montré que GABARAP inhibe la formation des métastases dans un modèle de cancer de l'ovaire par son implication dans l'inhibition de l'expression du VEGF et de HIF-1 α . GABARAP interagit avec le VEGFR2 (Vascular epithelium growth factor 2) conduisant à une inhibition de la voie PI3K/Akt et donc à une inhibition de l'angiogenèse et la formation des métastases (Park et al., 2014). Bien que les protéines GABARAP n'aient à ce jour pas été décrites comme impliquées dans l'autophagie de type LAP, la LAP médiée par GABARAP pourrait induire la dégradation du récepteur VEGFR2 et donc inhiber l'angiogenèse et la formation des métastases dans ce modèle.

Rôles compensatoires des protéines ATG8 et rôles opposés

Comme nous l'avons précédemment décrit dans la partie I. Protéines ATG8 et autophagie, les protéines de la famille ATG8 ont été décrites comme ayant des rôles redondants puis nos études ainsi que d'autres études récentes ont permis de mettre en évidence que ces protéines pouvaient avoir des rôles plus spécifiques comme dans l'autophagie sélective ou encore dans l'initiation de l'autophagie où les protéines LC3 et GABARAP ont été décrites comme ayant des rôles opposés dans la régulation de ULK1. C'est pourquoi, nous nous sommes demandé quel serait l'impact de l'invalidation de GABARAP dans les cellules KO GABARAPL1 sur la TEM. De manière surprenante, la double invalidation GABARAPL1/GABARAP ne modifie pas l'engagement en TEM par rapport aux cellules KO GABARAPL1. En effet, l'augmentation du taux de N-Cadhérine observée dans les cellules KO GABARAPL1 est également observée dans les cellules DKO GABARAPL1/GABARAP. Toutefois, la diminution du taux de E-Cadhérine observée dans les cellules KO GABARAPL1 n'est pas retrouvée dans les cellules DKO GABARAPL1/GABARAP. En effet, l'invalidation de GABARAP dans les cellules KO GABARAPL1 conduit à la restauration du taux de E-Cadhérine à un niveau similaire, voir même légèrement supérieur aux cellules A549c en faisant intervenir une régulation au niveau transcriptionnel. Ces résultats pourraient également expliquer que les cellules double KO GABARAPL1/GABARAP soient moins invasives que les cellules KO GABARAPL1 et A549c et suggèrent qu'une augmentation du taux de N-Cadhérine n'est pas suffisante pour l'acquisition de propriété de mobilité, mais qu'il faut également une diminution de la E-Cadhérine.

Comme le flux autophagique n'est pas modifié dans les cellules A549 KO GABARAPL1 mais est inhibé dans les cellules A549 DKO GABARAPL1/GABARAP, l'ensemble de ces observations suggèrent une

implication de GABARAPL1 dans la dégradation par autophagie sélective d'acteurs impliqués dans le maintien des caractéristiques épithéliales des cellules et une implication de l'autophagie sélective médiée par GABARAP et/ou du flux autophagique dans la régulation de l'expression de la E-Cadhérine mais pas de la N-Cadhérine. Une étude récente réalisée dans les cellules A549 montre que l'inhibition de l'autophagie par la Bafilomycine A1 conduit à une diminution de la Vimentine et de la N-Cadhérine alors que le taux de E-Cadhérine reste inchangé (Alizadeh et al., 2018). Ces résultats suggèrent que le flux autophagique ne régule pas le taux de E-Cadhérine dans ces cellules et ainsi que dans notre modèle DKO GABARAPL1/GABARAP ce soit l'autophagie médiée par GABARAP qui soit impliquée dans la restauration du taux de E-Cadhérine. Ainsi, GABARAP pourrait permettre la dégradation de co-régulateurs ou encore d'enzymes impliqués dans la régulation épigénétique de l'expression de la E-Cadhérine. Ces résultats montrent alors que malgré des rôles parfois redondants des protéines ATG8, chaque membre pourrait avoir un rôle bien défini et que les protéines ATG8 pourraient avoir des rôles opposés tel que GABARAP et GABARAPL1 dans la régulation de l'expression de la E-Cadhérine.

L'ensemble de ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un rôle complexe des protéines ATG8 dans l'autophagie, dans le cancer et la TEM.

Nous avons initialement montré que le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie peut dépendre de sa localisation au niveau des autophagosomes. En effet, lors de la régulation du flux autophagique basal et des étapes précoces, il n'est pas nécessaire que GABARAPL1 soit localisée au niveau des autophagosomes alors que lors de la régulation du flux autophagique induit et des étapes plus tardives, GABARAPL1 doit être localisée au niveau des autophagosomes.

De manière similaire, les rôles de GABARAPL1 dans la carcinogenèse peuvent être dépendants ou indépendants de sa localisation. En effet, GABARAPL1 inhibe de nombreux phénotypes cancéreux de manière dépendante de sa localisation au niveau des autophagosomes. Pourtant lors de l'étude des phénotypes de migration *in vitro* ou de la croissance tumorale *in vivo*, GABARAPL1 inhibe ces phénotypes indépendamment de sa localisation suggérant un rôle complexe de GABARAPL1. En effet, les protéines de la sous-famille GABARAP, mais également les autres protéines ATG8, ont été décrites comme inhibant la progression tumorale par leur implication dans la dégradation sélective d'oncogènes cellulaires mais également d'organites. Notre étude montre ainsi un rôle complexe de GABARAPL1 dans la progression tumorale et implique un rôle indépendant de la dégradation par autophagie sélective et suggère que GABARAPL1 peut également réguler la progression tumorale par une implication dans la régulation de voies de signalisation. En effet, il a été décrit que GABARAPL1 permettrait la régulation de la voie Wnt et ainsi de la carcinogenèse.

Nous avons également montré que GABARAPL1 permet l'inhibition de la TEM par son rôle dans la dégradation des protéines SMAD impliquées dans la régulation de la TEM. Au vu de l'implication de GABARAPL1 dans l'inhibition de la TEM, il serait intéressant de déterminer le rôle de GABARAPL1 dans la formation des métastases, dans la résistance aux traitements mais également dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire.

Finalement, notre étude a également permis de mettre en évidence que les protéines ATG8 pouvaient avoir des rôles spécifiques et même opposés. En effet, nous avons montré que GABARAPL1 permet d'activer ULK1 alors que les protéines LC3 ont été décrites comme inhibant ULK1 puis, GABARAPL1 inhiberait la transcription de *CDH1/E-Cadhérine* alors que GABARAP induirait son expression.

III. Perspectives à long terme

Compte tenu de ces résultats, de nombreuses questions sur le rôle de GABARAPL1 dans la carcinogenèse et dans TEM, sur la régulation de l'expression de GABARAPL1 mais également du flux autophagique lors de la TEM restent en suspens.

Il serait intéressant d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions de GABARAPL1 dans la régulation du flux basal et induit mais également dans l'inhibition de certains phénotypes cancéreux comme la croissance tumorale lors de la surexpression de GABARAPL1 ou de GABARAPL1-G116A en étudiant la voie Wnt, préalablement décrite comme négativement régulée par GABARAPL1 (Zhang et al., 2011).

Nous avons suggéré que GABARAPL1 pourrait dégrader sélectivement les protéines SMAD inhibant ainsi la TEM. Des expériences de co-localisation des protéines SMAD dans les autophagosomes par immunofluorescence permettront de confirmer la dégradation de ces protéines par autophagie. Puis, des expériences de co-immunoprécipitation permettront de mettre en évidence une potentielle interaction entre les protéines GABARAPL1 et les protéines SMAD.

Nous avons également montré que l'induction de la TEM par un co-traitement TGF β /TNF α augmente fortement l'expression de GABARAPL1 alors que l'expression des autres ATG8 n'est pas modifiée. Il serait intéressant de mettre en évidence quels sont les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de GABARAPL1. Il a été montré que les facteurs de transcription SMAD permettent la régulation de BECLIN1, ATG7 et de ATG5. Une étude bioinformatique, nous a permis de mettre en évidence, la fixation potentielle des protéines SMAD sur le promoteur de GABARAPL1. Ainsi, afin de vérifier si les voies SMAD pourraient également être impliquées dans la régulation de l'expression de GABARAPL1, nous allons induire la TEM par un co-traitement TGF β /TNF α tout en inhibant les voies

SMAD par un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de SMAD3, SIS3. Dans ces conditions de traitement, l'étude de l'expression de GABARAPL1 nous permettra de mettre en évidence l'implication des protéines SMAD dans cette régulation. Puis, l'implication des protéines SMAD dans la régulation de l'expression de GABARAPL1 sera confirmée par une expérience de chromatine immunoprécipitation. Ce qui permettra également de mettre en évidence la zone de fixation de ces facteurs de transcription sur le promoteur de GABARAPL1. Si les protéines SMAD ne sont pas impliquées dans la régulation de l'expression de GABARAPL1, nous étudierons si SNAI1 peut réguler GABARAPL1 puisque lors de l'induction de la TEM, son expression est fortement augmentée.

De plus, il a été montré que le TGF β est impliqué dans l'induction de l'autophagie. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact du co-traitement TGF β /TNF α sur le flux autophagique dans nos modèles mais également des simples traitement TGF β et TNF α . De plus, une étude transcriptomique sur des cellules induites en TEM par le TGF β permettra de mettre en évidence les différents acteurs permettant d'expliquer la régulation de l'autophagie au cours de la TEM.

Ces études permettront de mettre en évidence l'existence de potentielles boucles de rétrocontrôle de l'autophagie sur la TEM et de la TEM sur l'autophagie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abeliovich, H., Dunn, W.A., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000). Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J. Cell Biol.* *151*, 1025–1034.
- Aghdassi, A., Sendler, M., Guenther, A., Mayerle, J., Behn, C.-O., Heidecke, C.-D., Friess, H., Büchler, M., Evert, M., Lerch, M.M., et al. (2012). Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut* *61*, 439–448.
- Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* *59*, 59–65.
- Akalay, I., Janji, B., Hasmim, M., Noman, M.Z., Thiery, J.P., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2013). EMT impairs breast carcinoma cell susceptibility to CTL-mediated lysis through autophagy induction. *Autophagy* *9*, 1104–1106.
- Alam, J., DeHaro, D., Redding, K.M., Re, R.N., and Cook, J.L. (2010). C-Terminal Processing of GABARAP is Not Required for Trafficking of the Angiotensin II Type 1A Receptor. *Regul. Pept.* *159*, 78–86.
- Albanesi, J., Wang, H., Sun, H.-Q., Levine, B., and Yin, H. (2015). GABARAP-mediated targeting of PI4K2A/PI4KII α to autophagosomes regulates PtdIns4P-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* *11*, 2127–2129.
- Albert, J.M., Kim, K.W., Cao, C., and Lu, B. (2006). Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 1183–1189.
- Alemu, E.A., Lamark, T., Torgersen, K.M., Birgisdottir, A.B., Larsen, K.B., Jain, A., Olsvik, H., Overvatn, A., Kirkin, V., and Johansen, T. (2012). ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex: SEQUENCE REQUIREMENTS FOR LC3-INTERACTING REGION (LIR) MOTIFS. *J. Biol. Chem.* *287*, 39275–39290.
- Alexander, N.R., Tran, N.L., Rekapally, H., Summers, C.E., Glackin, C., and Heimark, R.L. (2006). N-cadherin Gene Expression in Prostate Carcinoma Is Modulated by Integrin-Dependent Nuclear Translocation of Twist1. *Cancer Res.* *66*, 3365–3369.
- Alizadeh, J., Glogowska, A., Thliveris, J., Kalantari, F., Shojaei, S., Hombach-Klonisch, S., Klonisch, T., and Ghavami, S. (2018). Autophagy modulates transforming growth factor beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* *1865*, 749–768.
- Anding, A.L., and Baehrecke, E.H. (2017). Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev. Cell* *41*, 10–22.
- Andre, F., Berrada, N., and Desmedt, C. (2010). Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Curr. Opin. Oncol.* *22*, 547–551.
- Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* *116*, 217–224.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* *14*, 79–89.

Aplin, A., Jasionowski, T., Tuttle, D.L., Lenk, S.E., and Dunn, W.A. (1992). Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J. Cell. Physiol.* *152*, 458–466.

Artal-Martinez de Narvajás, A., Gomez, T.S., Zhang, J.-S., Mann, A.O., Taoda, Y., Gorman, J.A., Herreros-Villanueva, M., Gress, T.M., Ellenrieder, V., Bujanda, L., et al. (2013). Epigenetic Regulation of Autophagy by the Methyltransferase G9a. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 3983–3993.

Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., and Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* *69*, 5820–5828.

Barberà, M.J., Puig, I., Domínguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiró, S., Baulida, J., Francí, C., Dedhar, S., Larue, L., et al. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* *23*, 7345–7354.

B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7683–7699.

Belaid, A., Cerezo, M., Chargui, A., Corcelle-Termeau, E., Pedetour, F., Giuliano, S., Ilie, M., Rubera, I., Tauc, M., Barale, S., et al. (2013). Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res.* *73*, 4311–4322.

Berthier, A., Seguin, S., Sasco, A.J., Bobin, J.Y., De Laroche, G., Datchary, J., Saez, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Tolle, F., Fraichard, A., et al. (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.

Bertrand, M., Petit, V., Jain, A., Amsellem, R., Johansen, T., Larue, L., Codogno, P., and Beau, I. (2015). SQSTM1/p62 regulates the expression of junctional proteins through epithelial-mesenchymal transition factors. *Cell Cycle Georget. Tex* *14*, 364–374.

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001). Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Mol. Biol. Cell* *12*, 27–36.

Bhujabal, Z., Birgisdottir, Å.B., Sjøttem, E., Brenne, H.B., Øvervatn, A., Habisov, S., Kirkin, V., Lamark, T., and Johansen, T. (2017). FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep.* *18*, 947–961.

Bierie, B., and Moses, H.L. (2006a). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* *17*, 29–40.

Bierie, B., and Moses, H.L. (2006b). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 506–520.

Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1198*, 11–26.

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

Birgisdottir, Å.B., Mouilleron, S., Bhujabal, Z., Wirth, M., Sjøttem, E., Evjen, G., Zhang, W., Lee, R., O'Reilly, N., Tooze, S.A., et al. (2019). Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAPL1 via LIR motifs. *Autophagy* *0*, 1–23.

- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* *348 Pt 2*, 241–255.
- Bishop, E., and Bradshaw, T.D. (2018). Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- Boland, B., Yu, W.H., Corti, O., Mollereau, B., Henriques, A., Bezard, E., Pastores, G.M., Rubinsztein, D.C., Nixon, R.A., Duchen, M.R., et al. (2018). Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* *17*, 660–688.
- Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* *116*, 499–511.
- Boyer-Guittaut, M., Poillet, L., Liang, Q., Bôle-Richard, E., Ouyang, X., Benavides, G.A., Chakrama, F.-Z., Fraichard, A., Darley-Usmar, V.M., Despouy, G., et al. (2014). The role of GABARAP1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy* *10*, 986–1003.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., and Weinberg, R.A. (2018). EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *18*, 128–134.
- Brieher, W.M., and Yap, A.S. (2013). Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 39–46.
- Brigger, D., Torbett, B.E., Chen, J., Fey, M.F., and Tschan, M.P. (2013a). Inhibition of GATE-16 attenuates ATRA-induced neutrophil differentiation of APL cells and interferes with autophagosome formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *438*, 283–288.
- Brigger, D., Torbett, B.E., Chen, J., Fey, M.F., and Tschan, M.P. (2013b). Inhibition of GATE-16 attenuates ATRA-induced neutrophil differentiation of APL cells and interferes with autophagosome formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *438*, 283–288.
- Buchberger, A., Bukau, B., and Sommer, T. (2010). Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol. Cell* *40*, 238–252.
- Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V.P., Yadav, A.S., Kumar, D., and Kundu, G.C. (2018). Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol. Cancer* *17*.
- Byles, V., Zhu, L., Lovaas, J., Chmielewski, L., Wang, J., Faller, D., and Dai, Y. (2012). SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene* *31*, 4619–4629.
- Cai, Z., Zeng, W., Tao, K., E, Z., Wang, B., and Yang, Q. (2015). Chaperone-mediated autophagy: roles in neuroprotection. *Neurosci. Bull.* *31*, 452–458.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* *2*, 76–83.
- Cao, C., Subhawong, T., Albert, J.M., Kim, K.W., Geng, L., Sekhar, K.R., Gi, Y.J., and Lu, B. (2006). Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Res.* *66*, 10040–10047.

Carroll, B., Maetzel, D., Maddocks, O.D., Otten, G., Ratcliff, M., Smith, G.R., Dunlop, E.A., Passos, J.F., Davies, O.R., Jaenisch, R., et al. (2016). Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *ELife* 5.

Carroll, B., Otten, E.G., Manni, D., Stefanatos, R., Menzies, F.M., Smith, G.R., Jurk, D., Kenneth, N., Wilkinson, S., Passos, J.F., et al. (2018). Oxidation of SQSTM1/p62 mediates the link between redox state and protein homeostasis. *Nat. Commun.* 9.

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

Chakrama, F.Z., Seguin-Py, S., Le Grand, J.N., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Despouy, G., Perez, V., Jouvenot, M., and Boyer-Guittaut, M. (2010). GABARAP1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 6, 495–505.

Chang, T.-H., Tsai, M.-F., Su, K.-Y., Wu, S.-G., Huang, C.-P., Yu, S.-L., Yu, Y.-L., Lan, C.-C., Yang, C.-H., Lin, S.-B., et al. (2011). Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1071–1079.

Chen, Z.-W., and Olsen, R.W. (2007). GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J. Neurochem.* 100, 279–294.

Chen, A., Beetham, H., Black, M.A., Priya, R., Telford, B.J., Guest, J., Wiggins, G.A.R., Godwin, T.D., Yap, A.S., and Guilford, P.J. (2014). E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 14.

Chen, C., Wang, Y., Huang, P., and Liu-Chen, L.-Y. (2011). Effects of C-terminal modifications of GEC1 protein and gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor-associated protein (GABARAP), two microtubule-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J. Biol. Chem.* 286, 15106–15115.

Chen, Y., Li, X., Wu, X., He, C., Guo, L., Zhang, S., Xiao, Y., Guo, W., and Tan, B. (2013). Autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 impact the efficacy of chemoradiation on esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 209, 562–567.

Chen, Y., Scarcelli, V., and Legouis, R. (2017). Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cells* 6.

Chen, Z., Nie, S.-D., Qu, M.-L., Zhou, D., Wu, L.-Y., Shi, X.-J., Ma, L.-R., Li, X., Zhou, S.-L., Wang, S., et al. (2018). The autophagic degradation of Cav-1 contributes to PA-induced apoptosis and inflammation of astrocytes. *Cell Death Dis.* 9, 771.

Cheng, G.Z., Zhang, W.Z., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., and Wang, L.-H. (2008). Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *J. Biol. Chem.* 283, 14665–14673.

Cho, D.-H., Jo, Y.K., Kim, S.C., Park, I.J., and Kim, J.C. (2012). Down-regulated expression of ATG5 in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 32, 4091–4096.

Cho, E.S., Kang, H.E., Kim, N.H., and Yook, J.I. (2019). Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Arch. Pharm. Res.* 42, 14–24.

- Choi, S.L., Kim, S.J., Lee, K.T., Kim, J., Mu, J., Birnbaum, M.J., Soo Kim, S., and Ha, J. (2001). The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 92–97.
- Chude, C.I., and Amaravadi, R.K. (2017). Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Cicchini, M., Chakrabarti, R., Kongara, S., Price, S., Nahar, R., Lozy, F., Zhong, H., Vazquez, A., Kang, Y., and Karantza, V. (2014). Autophagy regulator BECN1 suppresses mammary tumorigenesis driven by WNT1 activation and following parity. *Autophagy* *10*, 2036–2052.
- Colella, B., Faienza, F., Carinci, M., D'Alessandro, G., Catalano, M., Santoro, A., Cecconi, F., Limatola, C., and Di Bartolomeo, S. (2019). Autophagy induction impairs Wnt/ β -catenin signalling through β -catenin relocalisation in glioblastoma cells. *Cell. Signal.* *53*, 357–364.
- Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* *229*, 558–565.
- Costantino, M.E., Stearman, R.P., Smith, G.E., and Darling, D.S. (2002). Cell-Specific Phosphorylation of Zfh9 Transcription Factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 368–373.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., and Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* *107*, 526–545.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* *273*, 501–503.
- Cuervo, A.M., Terlecky, S.R., Dice, J.F., and Knecht, E. (1994). Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* *269*, 26374–26380.
- Dalal, B.I., Keown, P.A., and Greenberg, A.H. (1993). Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.* *143*, 381–389.
- Daniel, F., Legrand, A., Pessayre, D., Borrega-Pires, F., Mbida, L., Lardeux, B., Degott, C., Nhieu, J.T. van, and Bernuau, D. (2007). Beclin 1 mRNA Strongly Correlates with Bcl-XLmRNA Expression in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Invest.* *25*, 226–231.
- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S., and Pal, M. (2019). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J. Cell. Physiol.*
- Daskalaki, I., Gkikas, I., and Tavernarakis, N. (2018). Hypoxia and Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* *6*.
- Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* *377*, 421–425.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* *60*, 604–617.

- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 275–284.
- DeCosse, J.J., Gossens, C., Kuzma, J.F., and Unsworth, B.R. (1975). Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 913–922.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17, 3091–3100.
- Dennler, S., Huet, S., and Gauthier, J.M. (1999). A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene* 18, 1643–1648.
- Deter, R.L., and de Duve, C. (1967). INFLUENCE OF GLUCAGON, AN INDUCER OF CELLULAR AUTOPHAGY, ON SOME PHYSICAL PROPERTIES OF RAT LIVER LYSOSOMES. *J. Cell Biol.* 33, 437–449.
- Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell, S.R., Freundlieb, S., and Terlecky, L.J. (1990). A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Semin. Cell Biol.* 1, 449–455.
- Dijke, P.T., Goumans, M.-J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J. Cell. Physiol.* 191, 1–16.
- ten Dijke, P., and Arthur, H.M. (2007). Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 857–869.
- Ding, L., Zhang, W., Yang, L., Pelicano, H., Zhou, K., Yin, R., Huang, R., and Zeng, J. (2018). Targeting the autophagy in bone marrow stromal cells overcomes resistance to vorinostat in chronic lymphocytic leukemia. *OncoTargets Ther.* 11, 5151–5170.
- Ding, Y., Kim, S. I., Lee, S.-Y., Koo, J.K., Wang, Z., and Choi, M.E. (2014). Autophagy Regulates TGF-Expression and Suppresses Kidney Fibrosis Induced by Unilateral Ureteral Obstruction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 2835–2846.
- Dong, C., Wu, Y., Wang, Y., Wang, C., Kang, T., Rychahou, P.G., Chi, Y.-I., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2013). Interaction with Suv39H1 is Critical for Snail-mediated E-cadherin Repression in Breast Cancer. *Oncogene* 32, 1351–1362.
- Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell* 55, 238–252.
- Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.-A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B.C., Drake, A.M., Shah, P.P., et al. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527, 105–109.
- Du, C., Zhang, C., Hassan, S., Biswas, M.H.U., and Balaji, K.C. (2010). Protein Kinase D1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Phosphorylation of Snail. *Cancer Res.* 70, 7810–7819.
- Dunlop, E.A., and Tee, A.R. (2014). mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 121–129.
- Ebner, P., Poetsch, I., Deszcz, L., Hoffmann, T., Zuber, J., and Ikeda, F. (2018). The IAP family member BRUCE regulates autophagosome–lysosome fusion. *Nat. Commun.* 9, 599.

- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S.R., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., and Martin, S.J. (2011). Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol. Cell* 42, 23–35.
- Falasca, L., Torino, F., Marconi, M., Costantini, M., Pompeo, V., Sentinelli, S., De Salvo, L., Patrizio, M., Padula, C., Gallucci, M., et al. (2015). AMBRA1 and SQSTM1 expression pattern in prostate cancer. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 20, 1577–1586.
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., and Lander, E.S. (1999). Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 97, 727–741.
- Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes. *J. Biol. Chem.* 281, 36303–36316.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8204.
- Feuerhake, F., Sigg, W., Höfter, E.A., Dimpfl, T., and Welsch, U. (2000). Immunohistochemical analysis of Bcl-2 and Bax expression in relation to cell turnover and epithelial differentiation markers in the non-lactating human mammary gland epithelium. *Cell Tissue Res.* 299, 47–58.
- Firulli, B.A., Krawchuk, D., Centonze, V.E., Vargesson, N., Virshup, D.M., Conway, S.J., Cserjesi, P., Laufer, E., and Firulli, A.B. (2005). Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat. Genet.* 37, 373–381.
- Firulli, B.A., Redick, B.A., Conway, S.J., and Firulli, A.B. (2007). Mutations within helix I of Twist1 result in distinct limb defects and variation of DNA binding affinities. *J. Biol. Chem.* 282, 27536–27546.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472–476.
- Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S., et al. (2012). ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8, 915–926.
- Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 75, 681–692.
- Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., Liao, L., and Xu, J. (2011). The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* 21, 275–289.
- Fu, M., Nirschl, J.J., and Holzbaur, E.L.F. (2014). LC3 Binding to the Scaffolding Protein JIP1 Regulates Processive Dynein-Driven Transport of Autophagosomes. *Dev. Cell* 29, 577–590.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* 19, 2092–2100.

Fukagawa, A., Ishii, H., Miyazawa, K., and Saitoh, M. (2015). δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med.* 4, 125–135.

Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E., and Debnath, J. (2008). Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Mol. Biol. Cell* 19, 797–806.

Fuxe, J., and Karlsson, M.C.I. (2012). TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: A link between cancer and inflammation. *Semin. Cancer Biol.* 22, 455–461.

Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., Dinsdale, D., Condorelli, F., Brandner, S., Campanella, M., et al. (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32, 699–712.

Galluzzi, L., Vicencio, J.M., Kepp, O., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2008). To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr. Mol. Med.* 8, 78–91.

Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 12297–12305.

Gollob, J.A., Wilhelm, S., Carter, C., and Kelley, S.L. (2006). Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway. *Semin. Oncol.* 33, 392–406.

Gough, D.R., and Cotter, T.G. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis.* 2, e213.

Goussetis, D.J., Gounaris, E., Wu, E.J., Vakana, E., Sharma, B., Bogyo, M., Altman, J.K., and Plataniias, L.C. (2012). Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood* 120, 3555–3562.

Grassi, G., Di Caprio, G., Santangelo, L., Fimia, G.M., Cozzolino, A.M., Komatsu, M., Ippolito, G., Tripodi, M., and Alonzi, T. (2015). Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis.* 6, e1880.

Grotegut, S., von Schweinitz, D., Christofori, G., and Lehembre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J.* 25, 3534–3545.

Grunwald, D.S., Otto, N.M., Park, J.-M., Song, D., and Kim, D.-H. (2019). GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for autophagy induction. *Autophagy* 1–15.

Gu, Y., Princely Abudu, Y., Kumar, S., Bissa, B., Choi, S.W., Jia, J., Lazarou, M., Eskelinen, E.-L., Johansen, T., and Deretic, V. (2019). Mammalian Atg8 proteins regulate lysosome and autolysosome biogenesis through SNAREs. *EMBO J.* 38, e101994.

Guang, M.H.Z., Kavanagh, E.L., Dunne, L.P., Dowling, P., Zhang, L., Lindsay, S., Bazou, D., Goh, C.Y., Hanley, C., Bianchi, G., et al. (2019). Targeting Proteotoxic Stress in Cancer: A Review of the Role that Protein Quality Control Pathways Play in Oncogenesis. *Cancers* 11.

Gugnoni, M., Sancisi, V., Gandolfi, G., Manzotti, G., Ragazzi, M., Giordano, D., Tamagnini, I., Tigano, M., Frasoldati, A., Piana, S., et al. (2017). Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy. *Oncogene* 36, 667–677.

Gulhati, P., Bowen, K.A., Liu, J., Stevens, P.D., Rychahou, P.G., Chen, M., Lee, E.Y., Weiss, H.L., O'Connor, K.L., Gao, T., et al. (2011). mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 71, 3246–3256.

- Guo, H., Chitiprolu, M., Gagnon, D., Meng, L., Perez-Iratxeta, C., Lagace, D., and Gibbings, D. (2014). Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nat. Commun.* *5*, 5276.
- Guo, S., Liang, X., Guo, M., Zhang, X., and Li, Z. (2018). Migration inhibition of water stress proteins from *Nostoc commune* Vauch. via activation of autophagy in DLD-1 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* *119*, 669–676.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* *30*, 214–226.
- Haigis, M.C., and Sinclair, D.A. (2010). Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu. Rev. Pathol.* *5*, 253–295.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 37298–37302.
- Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M., Giang, K., Rikka, S., and Gustafsson, Å.B. (2012). Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *J. Biol. Chem.* *287*, 19094–19104.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* *441*, 885–889.
- Haslehurst, A.M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., Childs, T., Chen, J., Li, J., Weberpals, J., et al. (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* *12*, 91.
- Hata, A., Shi, Y., and Massagué, J. (1998). TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol. Med. Today* *4*, 257–262.
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T., and Barber, D.L. (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial–mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4750–4764.
- Hazan, R.B., Kang, L., Whooley, B.P., and Borgen, P.I. (1997). N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes. Commun.* *4*, 399–411.
- Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L., and Aaronson, S.A. (2000). Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induces Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *J. Cell Biol.* *148*, 779–790.
- Hazan, R.B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., and Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 155–163.
- He, R.-Q., Xiong, D.-D., Ma, J., Hu, X.-H., Chen, G., and Sun, W.-L. (2018). The Clinicopathological Significance and Correlative Signaling Pathways of an Autophagy-Related Gene, *Ambra1*, in Breast Cancer: a Study of 25 Microarray RNA-Seq Datasets and in-House Gene Silencing. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *51*, 1027–1040.

- Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V.M., Francí, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Di Croce, L., Helin, K., et al. (2008). Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4772–4781.
- Hervouet, E., Claude-Taupin, A., Gauthier, T., Perez, V., Fraichard, A., Adami, P., Despouy, G., Monnier, F., Algros, M.-P., Jouvenot, M., et al. (2015). The autophagy GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer* *15*, 729.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* *127*, 1375–1380.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., and Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* *5*, 973–979.
- Hotary, K., Li, X.-Y., Allen, E., Stevens, S.L., and Weiss, S.J. (2006). A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev.* *20*, 2673–2686.
- Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K.-P., Langer, E.M., Longmore, G.D., and Rauscher, F.J. (2008). The LIM Protein AJUBA Recruits Protein Arginine Methyltransferase 5 To Mediate SNAIL-Dependent Transcriptional Repression. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3198–3207.
- Hsu, D.S.-S., Lan, H.-Y., Huang, C.-H., Tai, S.-K., Chang, S.-Y., Tsai, T.-L., Chang, C.-C., Tzeng, C.-H., Wu, K.-J., Kao, J.-Y., et al. (2010). Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 4561–4571.
- Hsu, M.Y., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., and Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* *1*, 188–194.
- Hu, Y.-F., Lei, X., Zhang, H.-Y., Ma, J.-W., Yang, W.-W., Chen, M.-L., Cui, J., and Zhao, H. (2015). Expressions and clinical significance of autophagy-related markers Beclin1, LC3, and EGFR in human cervical squamous cell carcinoma. *OncoTargets Ther.* *8*, 2243–2249.
- Huang, R., and Liu, W. (2015). Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy. *Autophagy* *11*, 852–853.
- Huelsken, J., and Birchmeier, W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 547–553.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Isakson, P., Bjørås, M., Bøe, S.O., and Simonsen, A. (2010). Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* *116*, 2324–2331.
- Ishihara, M., Urushido, M., Hamada, K., Matsumoto, T., Shimamura, Y., Ogata, K., Inoue, K., Taniguchi, Y., Horino, T., Fujieda, M., et al. (2013). Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *305*, F495-509.
- Islam, Md.A., Sooro, M.A., and Zhang, P. (2018). Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

- Islam, S., Carey, T.E., Wolf, G.T., Wheelock, M.J., and Johnson, K.R. (1996). Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* *135*, 1643–1654.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* *6*, 764–776.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5360–5372.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* *151*, 1256–1269.
- Itoh, S., Landström, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.-H., Heldin, N.-E., and Dijke, P. ten (1998). Transforming Growth Factor β 1 Induces Nuclear Export of Inhibitory Smad7. *J. Biol. Chem.* *273*, 29195–29201.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J., and Ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem.* *267*, 6954–6967.
- Jacomin, A.-C., Samavedam, S., Promponas, V., and Nezis, I.P. (2016). iLIR database: A web resource for LIR motif-containing proteins in eukaryotes. *Autophagy* *12*, 1945–1953.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 247–269.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic Cph. Den.* *9*, 574–587.
- Jeanes, A., Gottardi, C., and Yap, A. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* *27*, 6920–6929.
- Jiang, G.-M., Wang, H.-S., Zhang, F., Zhang, K.-S., Liu, Z.-C., Fang, R., Wang, H., Cai, S.-H., and Du, J. (2013). Histone deacetylase inhibitor induction of epithelial–mesenchymal transitions via up-regulation of Snail facilitates cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1833*, 663–671.
- Jiang, Z.-F., Shao, L.-J., Wang, W.-M., Yan, X.-B., and Liu, R.-Y. (2012). Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 259–267.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., and Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* *137*, 721–735.
- Joachim, J., and Tooze, S.A. (2018). Control of GABARAP-mediated autophagy by the Golgi complex, centrosome and centriolar satellites. *Biol. Cell* *110*, 1–5.
- Joachim, J., Jefferies, H.B.J., Razi, M., Frith, D., Snijders, A.P., Chakravarty, P., Judith, D., and Tooze, S.A. (2015). Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130. *Mol. Cell* *60*, 899–913.
- Joachim, J., Razi, M., Judith, D., Wirth, M., Calamita, E., Encheva, V., Dynlacht, B.D., Snijders, A.P., O'Reilly, N., Jefferies, H.B.J., et al. (2017). Centriolar Satellites Control GABARAP Ubiquitination and GABARAP-Mediated Autophagy. *Curr. Biol. CB* *27*, 2123–2136.e7.

Joffroy, C.M., Buck, M.B., Stope, M.B., Popp, S.L., Pfizenmaier, K., and Knabbe, C. (2010). Antiestrogens induce transforming growth factor beta-mediated immunosuppression in breast cancer. *Cancer Res.* *70*, 1314–1322.

Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* *7*, 279–296.

Jordà, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A., and Fabra, A. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J. Cell Sci.* *118*, 3371–3385.

Joseph, J.V., Conroy, S., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Bhat, K., Copray, S., Walenkamp, A.M.E., Boddeke, E., Balasubramanyan, V., Wagemakers, M., et al. (2014). TGF β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* *5*, e1443.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1992–2003.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and 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., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* *117*, 2805–2812.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.

Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., and Germano, I. (2003). Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* *63*, 2103–2108.

Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* *126*, 5224–5238.

Kaufmann, A., Beier, V., Franquelim, H.G., and Wollert, T. (2014). Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell* *156*, 469–481.

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF β Receptor for Degradation. *Mol. Cell* *6*, 1365–1375.

Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J.* *17*, 4056–4065.

Keulers, T.G., Schaaf, M.B.E., Peeters, H.J.M., Savelkoul, K.G.M., Vooijs, M.A., Bussink, J., Jutten, B., and Rouschop, K.M.A. (2015). GABARAPL1 is required for increased EGFR membrane expression during hypoxia. *Radiother. Oncol.* *116*, 417–422.

- Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* *152*, 290–303.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* *33*, 109–122.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol. Cell* *34*, 259–269.
- Kiyono, K., Suzuki, H.I., Matsuyama, H., Morishita, Y., Komuro, A., Kano, M.R., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2009). Autophagy Is Activated by TGF- and Potentiates TGF- Mediated Growth Inhibition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res.* *69*, 8844–8852.
- Knorr, R.L., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Lipowsky, R., Baumgart, T., and Dimova, R. (2014). Membrane Morphology Is Actively Transformed by Covalent Binding of the Protein Atg8 to PE-Lipids. *PLoS ONE* *9*.
- Ko, Y.H., Cho, Y.-S., Won, H.S., Jeon, E.K., An, H.J., Hong, S.U., Park, J.H., and Lee, M.A. (2013). Prognostic significance of autophagy-related protein expression in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* *42*, 829–835.
- Köchl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic Cph. Den.* *7*, 129–145.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* *441*, 880–884.
- Kouno, T., Mizuguchi, M., Tanida, I., Ueno, T., Kanematsu, T., Mori, Y., Shinoda, H., Hirata, M., Kominami, E., and Kawano, K. (2005). Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *J. Biol. Chem.* *280*, 24610–24617.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* *14*, 230–239.
- Kroemer, G., Mariño, G., and 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., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* *432*, 1032–1036.
- Kumar, S., Jain, A., Farzam, F., Jia, J., Gu, Y., Choi, S.W., Mudd, M.H., Claude-Taupin, A., Wester, M.J., Lidke, K.A., et al. (2018). Mechanism of Stx17 recruitment to autophagosomes via IRGM and mammalian Atg8 proteins. *J. Cell Biol.* *217*, 997–1013.
- Kuwahara, Y., Oikawa, T., Ochiai, Y., Roudkenar, M.H., Fukumoto, M., Shimura, T., Ohtake, Y., Ohkubo, Y., Mori, S., Uchiyama, Y., et al. (2011). Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death Dis.* *2*, e177.
- Laiho, M., Weis, F.M., Boyd, F.T., Iqnotz, R.A., and Massagué, J. (1991). Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II. *J. Biol. Chem.* *266*, 9108–9112.

- Lamouille, S., and Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* *178*, 437–451.
- Landajuela, A., Hervás, J.H., Antón, Z., Montes, L.R., Gil, D., Valle, M., Rodriguez, J.F., Goñi, F.M., and Alonso, A. (2016). Lipid Geometry and Bilayer Curvature Modulate LC3/GABARAP-Mediated Model Autophagosomal Elongation. *Biophys. J.* *110*, 411–422.
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D.H., and Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* *17*, 3597–3607.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* *149*, 274–293.
- Lazarus, M.B., Novotny, C.J., and Shokat, K.M. (2015). Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* *10*, 257–261.
- Lazova, R., Camp, R.L., Klump, V., Siddiqui, S.F., Amaravadi, R.K., and Pawelek, J.M. (2012). Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis and poor outcome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 370–379.
- Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., and 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.
- Lefort, S., Joffre, C., Kieffer, Y., Givel, A.-M., Bourachot, B., Zago, G., Bieche, I., Dubois, T., Meseure, D., Vincent-Salomon, A., et al. (2014). Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy* *10*, 2122–2142.
- Li, J., Yang, B., Zhou, Q., Wu, Y., Shang, D., Guo, Y., Song, Z., Zheng, Q., and Xiong, J. (2013). Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis* *34*, 1343–1351.
- Li, L., Pan, X.-Y., Shu, J., Jiang, R., Zhou, Y.-J., and Chen, J.-X. (2014). Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanoma cells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biochimie* *103*, 89–100.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 99–146.
- Li, S., Zhang, H.-Y., Du, Z.-X., Li, C., An, M.-X., Zong, Z.-H., Liu, B.-Q., and Wang, H.-Q. (2016). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by Beclin 1 knockdown via posttranscriptional upregulation of ZEB1 in thyroid cancer cells. *Oncotarget* *7*, 70364–70377.
- Li, X., Lin, X., and Ma, H. (2015). Overexpression of LC3 in Papillary Thyroid Carcinomas and Lymph Node Metastases. *Acta Chir. Belg.* *115*, 356–363.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* *8*, 688–699.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672–676.

- Liao, H., Huang, Y., Guo, B., Liang, B., Liu, X., Ou, H., Jiang, C., Li, X., and Yang, D. (2015). Dramatic antitumor effects of the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD2014 in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 125–139.
- Lin, Y., Wu, Y., Li, J., Dong, C., Ye, X., Chi, Y.-I., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2010). The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.* *29*, 1803–1816.
- Liu, C., Xia, Y., Jiang, W., Liu, Y., and Yu, L. (2014). Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* *31*, 2043–2048.
- Liu, H., He, Z., von Rütte, T., Yousefi, S., Hunger, R.E., and Simon, H.-U. (2013a). Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. *Sci. Transl. Med.* *5*, 202ra123.
- Liu, H., Ma, Y., He, H.-W., Zhao, W.-L., and Shao, R.-G. (2017). SPHK1 (sphingosine kinase 1) induces epithelial-mesenchymal transition by promoting the autophagy-linked lysosomal degradation of CDH1/E-cadherin in hepatoma cells. *Autophagy* *13*, 900–913.
- Liu, K.-P., Zhou, D., Ouyang, D.-Y., Xu, L.-H., Wang, Y., Wang, L.-X., Pan, H., and He, X.-H. (2013b). LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *441*, 970–975.
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., et al. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* *14*, 177–185.
- Liu, X., Sun, K., Wang, H., and Dai, Y. (2016). Inhibition of Autophagy by Chloroquine Enhances the Antitumor Efficacy of Sorafenib in Glioblastoma. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 1197–1208.
- Lo, W.-L., Chu, P.-Y., Lee, T.-H., Su, T.-L., Chien, Y., Chen, Y.-W., Huang, P.-I., Tseng, L.-M., Tu, P.-H., Kao, S.-Y., et al. (2012). A combined DNA-affinic molecule and N-mustard alkylating agent has an anti-cancer effect and induces autophagy in oral cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 3277–3290.
- Lu, S., Nie, J., Luan, Q., Feng, Q., Xiao, Q., Chang, Z., Shan, C., Hess, D., Hemmings, B.A., and Yang, Z. (2011). Phosphorylation of the Twist1-Family Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors Is Involved in Pathological Cardiac Remodeling. *PLOS ONE* *6*, e19251.
- Lu, Y., Xiao, L., Liu, Y., Wang, H., Li, H., Zhou, Q., Pan, J., Lei, B., Huang, A., and Qi, S. (2015). MIR517C inhibits autophagy and the epithelial-to-mesenchymal (-like) transition phenotype in human glioblastoma through KPNA2-dependent disruption of TP53 nuclear translocation. *Autophagy* *11*, 2213–2232.
- Luciani, A., Villella, V.R., Esposito, S., Gavina, M., Russo, I., Silano, M., Guido, S., Pettoello-Mantovani, M., Carnuccio, R., Scholte, B., et al. (2012). Targeting autophagy as a novel strategy for facilitating the therapeutic action of potentiators on $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Autophagy* *8*, 1657–1672.
- Luo, D., Hu, S., Tang, C., and Liu, G. (2018). Mesenchymal stem cells promote cell invasion and migration and autophagy-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cell Biochem. Funct.* *36*, 88–94.

- Lv, Q., Wang, W., Xue, J., Hua, F., Mu, R., Lin, H., Yan, J., Lv, X., Chen, X., and Hu, Z.-W. (2012). DEDD Interacts with PI3KC3 to Activate Autophagy and Attenuate Epithelial–Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* *72*, 3238–3250.
- Lystad, A.H., Carlsson, S.R., Ballina, L.R. de la, Kauffman, K.J., Nag, S., Yoshimori, T., Melia, T.J., and Simonsen, A. (2019). Distinct functions of ATG16L1 isoforms in membrane binding and LC3B lipidation in autophagy-related processes. *Nat. Cell Biol.* *21*, 372–383.
- Macintosh, R.L., Timpson, P., Thorburn, J., Anderson, K.I., Thorburn, A., and Ryan, K.M. (2012). Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 2022–2029.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 741–752.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., et al. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* *452*, 650–653.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.Ng., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Mann, S.S., and Hammarback, J.A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* *269*, 11492–11497.
- Mansuy, V., Boireau, W., Fraichard, A., Schlick, J.-L., Jouvenot, M., and Delage-Mourroux, R. (2004). GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *325*, 639–648.
- Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., and Singh, R. (2013). Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat. Commun.* *4*.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.
- Massagué, J. (2008). TGFβ in Cancer. *Cell* *134*, 215–230.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* *21*, 1367–1381.
- Matsui, T., Jiang, P., Nakano, S., Sakamaki, Y., Yamamoto, H., and Mizushima, N. (2018). Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J Cell Biol* *217*, 2633–2645.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* *190*, 511–521.
- McEwan, D.G., and Dikic, I. (2015). PLEKHM1: Adapting to life at the lysosome. *Autophagy* *11*, 720–722.
- Mecca, C., Giambanco, I., Bruscoli, S., Bereshchenko, O., Fioretti, B., Riccardi, C., Donato, R., and Arcuri, C. (2018). PP242 Counteracts Glioblastoma Cell Proliferation, Migration, Invasiveness and Stemness Properties by Inhibiting mTORC2/AKT. *Front. Cell. Neurosci.* *12*.

- Medina, P. de, Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009). Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 5, 1066–1067.
- Mejlvang, J., Kriaievska, M., Vandewalle, C., Chernova, T., Sayan, A.E., Berx, G., Mellon, J.K., and Tulchinsky, E. (2007). Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* 18, 4615–4624.
- Mercier, I., Camacho, J., Titchen, K., Gonzales, D.M., Quann, K., Bryant, K.G., Molchansky, A., Milliman, J.N., Whitaker-Menezes, D., Sotgia, F., et al. (2012). Caveolin-1 and Accelerated Host Aging in the Breast Tumor Microenvironment. *Am. J. Pathol.* 181, 278–293.
- Miao, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Chen, L., and Wang, F. (2010). GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatogastroenterology*. 57, 257–261.
- Michell, R.H., Heath, V.L., Lemmon, M.A., and Dove, S.K. (2006). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* 31, 52–63.
- Mikaelian, I., Malek, M., Gadet, R., Viallet, J., Garcia, A., Girard-Gagnepain, A., Hesling, C., Gillet, G., Gonzalo, P., Rimokh, R., et al. (2013). Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF- β -independent mechanism. *Cancer Res.* 73, 6621–6631.
- Miki, Y., Nishisho, I., Horii, A., Miyoshi, Y., Utsunomiya, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Nakamura, Y. (1992). Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.* 52, 643–645.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y., and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 90, 1265–1273.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and 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., Tokuhiisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Cell Biol.* 152, 657–668.
- Mollereau, B., Rzechorzek, N.M., Roussel, B.D., Sedru, M., Van den Brink, D.M., Bailly-Maitre, B., Palladino, F., Medinas, D.B., Domingos, P.M., Hunot, S., et al. (2016). Adaptive preconditioning in neurological diseases - therapeutic insights from proteostatic perturbations. *Brain Res.* 1648, 603–616.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3, e2888.
- Mori, S., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Furukawa, F., Tahashi, Y., Yamagata, H., Sekimoto, G., Seki, T., Matsui, H., Nishizawa, M., et al. (2004). TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23, 7416–7429.
- Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S.-E.W., et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J. Exp. Med.* 208, 455–467.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGF β signal transduction. *Development* 136, 3699–3714.

- Mowers, E.E., Sharifi, M.N., and Macleod, K.F. (2017). Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* *36*, 1619–1630.
- Murray, D., Mirzayans, R., and McBride, W.H. (2018). Defenses against Pro-oxidant Forces - Maintenance of Cellular and Genomic Integrity and Longevity. *Radiat. Res.* *190*, 331.
- Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., and Sameshima, T. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol. Int.* *52*, 255–264.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* *130*, 165–178.
- Nemos, C., Mansuy, V., Vernier-Magnin, S., Fraichard, A., Jouvenot, M., and Delage-Mourroux, R. (2003). Expression of *gec1/GABARAPL1* versus *GABARAP* mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *119*, 216–219.
- New, J., Arnold, L., Ananth, M., Alvi, S., Thornton, M., Werner, L., Tawfik, O., Dai, H., Shnyder, Y., Kakarala, K., et al. (2017). Secretory autophagy in cancer-associated fibroblasts promotes head and neck cancer progression and offers a novel therapeutic target. *Cancer Res.* *77*, 6679–6691.
- Nguyen, T.N., Padman, B.S., Usher, J., Oorschot, V., Ramm, G., and Lazarou, M. (2016). Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J. Cell Biol.* *jcb.201607039*.
- Nieman, M.T., Prudoff, R.S., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell Biol.* *147*, 631–644.
- Nitta, T., Sato, Y., Ren, X.S., Harada, K., Sasaki, M., Hirano, S., and Nakanuma, Y. (2014). Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 4913–4921.
- Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* *211*, 781–790.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., et al. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* *11*, 45–51.
- Olsvik, H.L., Lamark, T., Takagi, K., Larsen, K.B., Evjen, G., Øvervatn, A., Mizushima, T., and Johansen, T. (2015). FYCO1 Contains a C-terminally Extended, LC3A/B-preferring LC3-interacting Region (LIR) Motif Required for Efficient Maturation of Autophagosomes during Basal Autophagy. *J. Biol. Chem.* *290*, 29361–29374.
- Onorati, A.V., Dyczynski, M., Ojha, R., and Amaravadi, R.K. (2018). Targeting autophagy in cancer. *Cancer* *124*, 3307–3318.
- Ota, I., Li, X.-Y., Hu, Y., and Weiss, S.J. (2009). Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20318–20323.
- Pang, M., Wang, H., Rao, P., Zhao, Y., Xie, J., Cao, Q., Wang, Y., Wang, Y.M., Lee, V.W., Alexander, S.I., et al. (2016). Autophagy links β -catenin and Smad signaling to promote epithelial-mesenchymal transition via upregulation of integrin linked kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *76*, 123–134.

- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 24131–24145.
- Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.-A., Lamark, T., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and 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.
- Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 895–902.
- Park, S.H., Kim, B.-R., Lee, J.H., Park, S.T., Lee, S.-H., Dong, S.M., and Rho, S.B. (2014). GABARBP down-regulates HIF-1 α expression through the VEGFR-2 and PI3K/mTOR/4E-BP1 pathways. *Cell. Signal.* *26*, 1506–1513.
- Pavlidis, S., Tsirigos, A., Migneco, G., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Flomenberg, N., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Pestell, R.G., et al. (2010). The autophagic tumor stroma model of cancer. *Cell Cycle* *9*, 3485–3505.
- Pavlidis, S., Vera, I., Gandara, R., Sneddon, S., Pestell, R.G., Mercier, I., Martinez-Outschoorn, U.E., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., et al. (2012). Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 1264–1284.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., and Cano, A. (2004). Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 306–319.
- Peinado, H., del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K.S.K., Vega, S., Nieto, M.A., Cano, A., and Portillo, F. (2005). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* *24*, 3446–3458.
- Pellerin, I., Vuillermoz, C., Jouvenot, M., Ordener, C., Royez, M., and Adessi, G.L. (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., and Fan, J. (2013a). Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy* *9*, 2056–2068.
- Peng, Y.-F., Shi, Y.-H., Shen, Y.-H., Ding, Z.-B., Ke, A.-W., Zhou, J., Qiu, S.-J., and Fan, J. (2013b). Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PLoS One* *8*, e74407.
- Peters, R., Leyvraz, S., and Perey, L. (1998). Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors. *Blood* *92*, 2041–2052.
- Petherick, K.J., Williams, A.C., Lane, J.D., Ordóñez-Morán, P., Huelsken, J., Collard, T.J., Smartt, H.J., Batson, J., Malik, K., Paraskeva, C., et al. (2013). Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J.* *32*, 1903–1916.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.

- Pirozzi, G., Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., La Rocca, A., Liguori, E., Martucci, N., Paino, F., Normanno, N., and Rocco, G. (2011). Epithelial to Mesenchymal Transition by TGF β -1 Induction Increases Stemness Characteristics in Primary Non Small Cell Lung Cancer Cell Line. *PLoS ONE* 6.
- Poillet-Perez, L., Jacquet, M., Hervouet, E., Gauthier, T., Fraichard, A., Borg, C., Pallandre, J.-R., Gonzalez, B.J., Ramdani, Y., Boyer-Guittaut, M., et al. (2017). GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncotarget* 8, 55998–56020.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J., and Kroll, K.L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* 22, 2453–2462.
- Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J. Biol. Chem.* 291, 6026–6035.
- Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J., and Lowy, D.R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 23, 1739–1748.
- Qiang, L., Zhao, B., Ming, M., Wang, N., He, T.-C., Hwang, S., Thorburn, A., and He, Y.-Y. (2014). Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9241–9246.
- Qin, W., Li, C., Zheng, W., Guo, Q., Zhang, Y., Kang, M., Zhang, B., Yang, B., Li, B., Yang, H., et al. (2015). Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells. *Oncotarget* 6, 39839–39854.
- Qiu, R.G., Chen, J., McCormick, F., and Symons, M. (1995). A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11781.
- Qu, B., Yao, L., Ma, H., Chen, H., Zhang, Z., and Xie, J. (2017). Prognostic significance of autophagy-related proteins expression in resected human gastric adenocarcinoma. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 37, 37–43.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., et al. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 112, 1809–1820.
- Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* 330, 1344–1348.
- Ran, L., Hong, T., Xiao, X., Xie, L., Zhou, J., and Wen, G. (2017). GABARAPL1 acts as a potential marker and promotes tumor proliferation and metastasis in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 8, 74519–74526.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O’Kane, C.J., Brown, S.D.M., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* 37, 771–776.
- Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O’Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2006). Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1209–1216.
- Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2005). Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 1, 101–109.

- Ren, B.-J., Zhou, Z.-W., Zhu, D.-J., Ju, Y.-L., Wu, J.-H., Ouyang, M.-Z., Chen, X.-W., and Zhou, S.-F. (2015). Alisertib Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, Autophagy and Suppresses EMT in HT29 and Caco-2 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Rho, S.B., Byun, H.-J., Kim, B.-R., Kim, I.S., Lee, J.H., Yoo, R., Park, S.T., and Park, S.H. (2013). GABAA receptor-binding protein promotes sensitivity to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Int. J. Oncol.* *42*, 1807–1814.
- Roberts, S.S., Mori, M., Pattee, P., Lapidus, J., Mathews, R., O'Malley, J.P., Hsieh, Y.C., Turner, M.A., Wang, Z., Tian, Q., et al. (2004). GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *22*, 4127–4134.
- Rodger, C.E., McWilliams, T.G., and Ganley, I.G. (2018). Mammalian mitophagy – from in vitro molecules to in vivo models. *Febs J.* *285*, 1185–1202.
- Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., and Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell* *53*, 167–178.
- Rogov, V.V., Stolz, A., Ravichandran, A.C., Rios-Szved, D.O., Suzuki, H., Kniss, A., Löhr, F., Wakatsuki, S., Dötsch, V., Dikic, I., et al. (2017). Structural and functional analysis of the GABARAP interaction motif (GIM). *EMBO Rep.* *18*, 1382–1396.
- Rouschop, K.M.A., Beucken, T. van den, Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., et al. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes *MAP1LC3B* and *ATG5*. *J. Clin. Invest.* *120*, 127–141.
- Sahu, S.K., Garding, A., Tiwari, N., Thakurela, S., Toedling, J., Gebhard, S., Ortega, F., Schmarowski, N., Berninger, B., Nitsch, R., et al. (2015). JNK-dependent gene regulatory circuitry governs mesenchymal fate. *EMBO J.* *34*, 2162–2181.
- Saika, S., Kono-Saika, S., Ohnishi, Y., Sato, M., Muragaki, Y., Ooshima, A., Flanders, K.C., Yoo, J., Anzano, M., Liu, C.-Y., et al. (2004). Smad3 Signaling Is Required for Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelium after Injury. *Am. J. Pathol.* *164*, 651–663.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–1501.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290–303.
- Sánchez-Tilló, E., Lázaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E.C., Castells, A., Engel, P., and Postigo, A. (2010). ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* *29*, 3490–3500.
- Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., and Postigo, A. (2011). β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19204–19209.
- Santanam, U., Banach-Petrosky, W., Abate-Shen, C., Shen, M.M., White, E., and DiPaola, R.S. (2016). Atg7 cooperates with Pten loss to drive prostate cancer tumor growth. *Genes Dev.* *30*, 399–407.

- Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., and Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* *112*, 1486–1494.
- Scherz-Shouval, R., Sagiv, Y., Shorer, H., and Elazar, Z. (2003). The COOH terminus of GATE-16, an intra-Golgi transport modulator, is cleaved by the human cysteine protease HsApg4A. *J. Biol. Chem.* *278*, 14053–14058.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* *26*, 1749–1760.
- Schwarten, M., Mohrlüder, J., Ma, P., Stoldt, M., Thielmann, Y., Stangler, T., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R., and Willbold, D. (2009). Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* *5*, 690–698.
- Sengupta, A., Molkentin, J.D., and Yutzey, K.E. (2009). FoxO Transcription Factors Promote Autophagy in Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* *284*, 28319–28331.
- Sharif, T., Martell, E., Dai, C., Kennedy, B.E., Murphy, P., Clements, D.R., Kim, Y., Lee, P.W.K., and Gujar, S.A. (2017). Autophagic homeostasis is required for the pluripotency of cancer stem cells. *Autophagy* *13*, 264–284.
- Shaw, R.J. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol.* *196*, 65–80.
- Shen, Y., Liang, L.-Z., Hong, M.-H., Xiong, Y., Wei, M., and Zhu, X.-F. (2008). [Expression and clinical significance of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin1 in epithelial ovarian cancer]. *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer* *27*, 595–599.
- Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar, E.B., Whetstone, J.R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M.P.-S., Nakatani, Y., and Shi, Y. (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* *422*, 735–738.
- Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 611–629.
- Shibue, T., Brooks, M.W., Inan, M.F., Reinhardt, F., and Weinberg, R.A. (2012). The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer Discov.* *2*, 706–721.
- Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S.A., Hamanaka, R.B., Goldman, A.E., Lucas, C.A., Shumaker, D.K., Kosak, S.T., Chandel, N.S., and Goldman, R.D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev.* *25*, 2579–2593.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and 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.
- Shingu, T., Fujiwara, K., Bögl, O., Akiyama, Y., Moritake, K., Shinojima, N., Tamada, Y., Yokoyama, T., and Kondo, S. (2009). Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int. J. Cancer* *124*, 1060–1071.
- Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 807–821.

Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135.

Sommers, C.L., Byers, S.W., Thompson, E.W., Torri, J.A., and Gelmann, E.P. (1994). Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 31, 325–335.

Sou, Y., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., et al. (2008). The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Mol. Biol. Cell* 19, 4762–4775.

Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engström, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., and Heldin, C.H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 28107–28115.

Stoletov, K., Kato, H., Zardoujian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S., and Klemke, R. (2010). Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* 123, 2332–2341.

Su, W., Li, S., Chen, X., Yin, L., Ma, P., Ma, Y., and Su, B. (2016). GABARAPL1 suppresses metastasis by counteracting PI3K/Akt pathway in prostate cancer. *Oncotarget* 8, 4449–4459.

Su, Y.-W., Xie, T.-X., Sano, D., and Myers, J.N. (2011). IL-6 Stabilizes Twist and Enhances Tumor Cell Motility in Head and Neck Cancer Cells through Activation of Casein Kinase 2. *PLOS ONE* 6, e19412.

Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M., and Hazan, R.B. (2002). A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2, 301–314.

Suzuki, S.W., Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2011). Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PloS One* 6, e17412.

Szalai, P., Hagen, L.K., Sætre, F., Luhr, M., Sponheim, M., Øverbye, A., Mills, I.G., Seglen, P.O., and Engedal, N. (2015). Autophagic bulk sequestration of cytosolic cargo is independent of LC3, but requires GABARAPs. *Exp. Cell Res.* 333, 21–38.

Takai, S., Schlom, J., Tucker, J., Tsang, K.Y., and Greiner, J.W. (2013). Inhibition of TGF-β1 signaling promotes central memory T cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 2299–2307.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25, 795–800.

Takehara, A., Hosokawa, M., Eguchi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Nakamura, Y., and Nakagawa, H. (2007). γ-Aminobutyric Acid (GABA) Stimulates Pancreatic Cancer Growth through Overexpressing GABAA Receptor π Subunit. *Cancer Res.* 67, 9704–9712.

Tang, D.Y.L., Ellis, R.A., and Lovat, P.E. (2016). Prognostic Impact of Autophagy Biomarkers for Cutaneous Melanoma. *Front. Oncol.* 6, 236.

Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., and 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., and Kominami, E. (2004a). Human Light Chain 3/MAP1LC3B Is Cleaved at Its Carboxyl-terminal Met121 to Expose Gly120 for Lipidation and Targeting to Autophagosomal Membranes. *J. Biol. Chem.* *279*, 47704–47710.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004b). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2503–2518.
- Terry, S., Buart, S., Tan, T.Z., Gros, G., Noman, M.Z., Lorens, J.B., Mami-Chouaib, F., Thiery, J.P., and Chouaib, S. (2017). Acquisition of tumor cell phenotypic diversity along the EMT spectrum under hypoxic pressure: Consequences on susceptibility to cell-mediated cytotoxicity. *Oncoimmunology* *6*.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871–890.
- Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* *8*, 369–380.
- Thompson, E.W., Paik, S., Brünner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S., and Lippman, M.E. (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.* *150*, 534–544.
- Thuault, S., Tan, E.-J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads Co-regulate SNAIL1 Expression during Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* *283*, 33437–33446.
- Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G.J., Ruijter, E.T., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J., and Schalken, J.A. (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* *60*, 3650–3654.
- Tong, H., Yin, H., Hossain, M.A., Wang, Y., Wu, F., Dong, X., Gao, S., Zhan, K., and He, W. (2018). Starvation-induced autophagy promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells via TGF- β 1/Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J. Cell. Biochem.*
- Tryndyak, V.P., Beland, F.A., and Pogribny, I.P. (2010). E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* *126*, 2575–2583.
- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell* *22*, 725–736.
- Tsubakihara, Y., and Moustakas, A. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., et al. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* *357*.
- Vaites, L.P., Paulo, J.A., Huttlin, E.L., and Harper, J.W. (2018). Systematic Analysis of Human Cells Lacking ATG8 Proteins Uncovers Roles for GABARAPs and the CCZ1/MON1 Regulator C18orf8/RMC1 in Macroautophagic and Selective Autophagic Flux. *Mol. Cell. Biol.* *38*, e00392-17.
- Vander Ark, A., Cao, J., and Li, X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell. Signal.* *52*, 112–120.

- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* *18*, 1131–1143.
- Vera-Ramirez, L., Vodnala, S.K., Nini, R., Hunter, K.W., and Green, J.E. (2018). Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat. Commun.* *9*.
- Vernier-Magnin, S., Muller, S., Sallot, M., Radom, J., Musard, J.F., Adami, P., Dulieu, P., Rémy-Martin, J.P., Jouvenot, M., and Fraichard, A. (2001). A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *284*, 118–125.
- Viñas-Castells, R., Beltran, M., Valls, G., Gómez, I., García, J.M., Montserrat-Sentís, B., Baulida, J., Bonilla, F., de Herreros, A.G., and Díaz, V.M. (2010). The Hypoxia-controlled FBXL14 Ubiquitin Ligase Targets SNAIL1 for Proteasome Degradation. *J. Biol. Chem.* *285*, 3794–3805.
- Vincent, T., Neve, E.P.A., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *11*, 943–950.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W., and Van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* *66*, 107–119.
- von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M.V., Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Mol. Cell* *48*, 329–342.
- Wang, H., and Olsen, R.W. (2000). Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J. Neurochem.* *75*, 644–655.
- Wang, H., Sun, H.-Q., Zhu, X., Zhang, L., Albanesi, J., Levine, B., and Yin, H. (2015). GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 7015–7020.
- Wang, J., Kang, R., Huang, H., Xi, X., Wang, B., Wang, J., and Zhao, Z. (2014). Hepatitis C virus core protein activates autophagy through EIF2AK3 and ATF6 UPR pathway-mediated MAP1LC3B and ATG12 expression. *Autophagy* *10*, 766–784.
- Wang, Y., Gan, G., Wang, B., Wu, J., Cao, Y., Zhu, D., Xu, Y., Wang, X., Han, H., Li, X., et al. (2017). Cancer-associated Fibroblasts Promote Irradiated Cancer Cell Recovery Through Autophagy. *EBioMedicine* *17*, 45–56.
- Wang, Z., Xu, L., Duan, Z., Zeng, L., Yan, N., and Peng, Z. (2007). Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells. *Gynecol. Oncol.* *107*, 107–113.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A.S., Ali, S., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., and Sarkar, F.H. (2009). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res.* *69*, 2400–2407.
- Webb, A.E., and Brunet, A. (2014). FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 159–169.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* *29*, 1792–1802.

- Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., and Elazar, Z. (2011). LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev. Cell* *20*, 444–454.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8788–8793.
- Wendt, M.K., Smith, J.A., and Schiemann, W.P. (2010). Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Facilitates Epidermal Growth Factor-Dependent Breast Cancer Progression. *Oncogene* *29*, 6485–6498.
- White, E., Mehnert, J.M., and Chan, C.S. (2015). Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 5037–5046.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth. *Science* *333*, 228–233.
- Wilson, M.I., Dooley, H.C., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2b and Atg16L1: setting the stage for autophagosome formation. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 1327–1334.
- Wirth, M., Zhang, W., Razi, M., Nyoni, L., Joshi, D., O'Reilly, N., Johansen, T., Tooze, S.A., and Moulleron, S. (2019). Molecular determinants regulating selective binding of autophagy adapters and receptors to ATG8 proteins. *Nat. Commun.* *10*, 1–18.
- Witta, S.E., Gemmill, R.M., Hirsch, F.R., Coldren, C.D., Hedman, K., Ravdel, L., Helfrich, B., Dziadziuszko, R., Chan, D.C., Sugita, M., et al. (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* *66*, 944–950.
- Wu, K., Fan, J., Zhang, L., Ning, Z., Zeng, J., Zhou, J., Li, L., Chen, Y., Zhang, T., Wang, X., et al. (2012). PI3K/Akt to GSK3 β / β -catenin signaling cascade coordinates cell colonization for bladder cancer bone metastasis through regulating ZEB1 transcription. *Cell. Signal.* *24*, 2273–2282.
- Wu, W.-Y., Kim, H., Zhang, C.-L., Meng, X.-L., and Wu, Z.-S. (2014). Clinical significance of autophagic protein LC3 levels and its correlation with XIAP expression in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *31*, 108.
- Wu, Y., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2009). Small C-terminal Domain Phosphatase Enhances Snail Activity through Dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* *284*, 640–648.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2000). A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 7853–7858.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1102.
- Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3290–3298.
- Xin, Y., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Fu, Q., Jiang, J., Zhang, P., Gong, R., and Zhao, S. (2001). Cloning, Expression Patterns, and Chromosome Localization of Three Human and Two Mouse Homologues of GABAA Receptor-Associated Protein. *Genomics* *74*, 408–413.

- Xu, M., Wang, S., Wang, Y., Wu, H., Frank, J.A., Zhang, Z., and Luo, J. (2018). Role of p38 γ MAPK in regulation of EMT and cancer stem cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1864*, 3605–3617.
- Xu, Y., Lee, S.-H., Kim, H.S., Kim, N.H., Piao, S., Park, S.-H., Jung, Y.S., Yook, J.I., Park, B.-J., and Ha, N.-C. (2010). Role of CK1 in GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation of snail. *Oncogene* *29*, 3124–3133.
- Xu, Z., Yang, L., Xu, S., Zhang, Z., and Cao, Y. (2015). The receptor proteins: pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *47*, 571–580.
- Yang, D.-S., Kumar, A., Stavrides, P., Peterson, J., Peterhoff, C.M., Pawlik, M., Levy, E., Cataldo, A.M., and Nixon, R.A. (2008a). Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *173*, 665–681.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., and Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* *31*, 110–123.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927–939.
- Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., and Wu, K.-J. (2008b). Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* *10*, 295–305.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'Antonio, G., et al. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* *25*, 717–729.
- Yang, Z., Rayala, S., Nguyen, D., Vadlamudi, R.K., Chen, S., and Kumar, R. (2005). Pak1 Phosphorylation of Snail, a Master Regulator of Epithelial-to-Mesenchyme Transition, Modulates Snail's Subcellular Localization and Functions. *Cancer Res.* *65*, 3179–3184.
- Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., and Nagayama, M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int. J. Oncol.* *22*, 891–898.
- Yoshioka, A., Miyata, H., Doki, Y., Yamasaki, M., Sohma, I., Gotoh, K., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Uchiyama, Y., and Monden, M. (2008). LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int. J. Oncol.* *33*, 461–468.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4952–4957.
- Yu, S., Li, G., Wang, Z., Wang, Z., Chen, C., Cai, S., and He, Y. (2016). Low expression of MAP1LC3B, associated with low Beclin-1, predicts lymph node metastasis and poor prognosis of gastric cancer. *Tumor Biol.* *37*, 15007–15017.
- Yue, J., and Mulder, K.M. (2000). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor- β . *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *142*, 125–131.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and 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.

- Zada, S., Hwang, J.S., Ahmed, M., Lai, T.H., Pham, T.M., and Kim, D.R. (2019). Control of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis by Autophagy-Dependent SNAI1 Degradation. *Cells* 8.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.-C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Böttinger, E.P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6686–6691.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892–10903.
- Zhang, W., Feng, M., Zheng, G., Chen, Y., Wang, X., Pen, B., Yin, J., Yu, Y., and He, Z. (2012). Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 679–685.
- Zhang, X., Wang, L., Lak, B., Li, J., Jokitalo, E., and Wang, Y. (2018a). GRASP55 Senses Glucose Deprivation through O-GlcNAcylation to Promote Autophagosome-Lysosome Fusion. *Dev. Cell* 45, 245-261.e6.
- Zhang, X., Schönrogge, M., Eichberg, J., Wendt, E.H.U., Kumstel, S., Stenzel, J., Lindner, T., Jaster, R., Krause, B.J., Vollmar, B., et al. (2018b). Blocking Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Chemotherapy of Pancreatic Cancer Cells. *Front. Oncol.* 8, 590.
- Zhang, Y., Wang, F., Han, L., Wu, Y., Li, S., Yang, X., Wang, Y., Ren, F., Zhai, Y., Wang, D., et al. (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.
- Zhang, Z., Zhang, L., Zhou, L., Lei, Y., Zhang, Y., and Huang, C. (2018c). Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress. *Redox Biol.*
- Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., and Zhu, W.-G. (2010). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nat. Cell Biol.* 12, 665–675.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Nature* 527, 525–530.
- Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931–940.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7, 1028–1034.
- Zhou, W., Xu, G., Wang, Y., Xu, Z., Liu, X., Xu, X., Ren, G., and Tian, K. (2016). Oxidative stress induced autophagy in cancer associated fibroblast enhances proliferation and metabolism of colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 16, 73–81.

Zhu, H., Wang, D., Zhang, L., Xie, X., Wu, Y., Liu, Y., Shao, G., and Su, Z. (2014). Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1 α promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia. *Oncol. Rep.* 32, 935–942.

Zhu, J., Li, Y., Tian, Z., Hua, X., Gu, J., Li, J., Liu, C., Jin, H., Wang, Y., Jiang, G., et al. (2017). ATG7 Overexpression Is Crucial for Tumorigenic Growth of Bladder Cancer In Vitro and In Vivo by Targeting the ETS2/miRNA196b/FOXO1/p27 Axis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 7, 299–313.

Zhu, L., Wang, Y., He, J., Tang, J., Lv, W., and Hu, J. (2018). Cytoplasmic SQSTM1/ P62 Accumulation Predicates a Poor Prognosis in Patients with Malignant Tumor. *J. Cancer* 9, 4072–4086.

Zi, D., Zhou, Z.-W., Yang, Y.-J., Huang, L., Zhou, Z.-L., He, S.-M., He, Z.-X., and Zhou, S.-F. (2015). Danusertib Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Autophagy but Inhibits Epithelial to Mesenchymal Transition Involving PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 27228–27251.

Zmijewski, J.W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E.R., and Abraham, E. (2010). Exposure to Hydrogen Peroxide Induces Oxidation and Activation of AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 33154.

Zou, J., Liu, Y., Li, B., Zheng, Z., Ke, X., Hao, Y., Li, X., Li, X., Liu, F., and Zhang, Z. (2017). Autophagy attenuates endothelial-to-mesenchymal transition by promoting Snail degradation in human cardiac microvascular endothelial cells. *Biosci. Rep.* 37.

Zou, M., Zhu, W., Wang, L., Shi, L., Gao, R., Ou, Y., Chen, X., Wang, Z., Jiang, A., Liu, K., et al. (2016). AEG-1/MTDH-activated autophagy enhances human malignant glioma susceptibility to TGF- β 1-triggered epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* 7, 13122–13138.

ANNEXES

Liste des communication orales

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. GABARAPL1 restrains Epithelial-Mesenchymal Transition through SMAD targeted autophagy degradation. *CFATG, Obernais, Novembre 2019*

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. Role of autophagy (ATG8 proteins) during Epithelial-Mesenchymal Transition of cancer cells. *Forum des jeunes chercheurs, Besançon, Juin 2018*

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. Role of autophagy (ATG8 proteins) during Epithelial-Mesenchymal Transition of cancer cells. *Oncotrans, Besançon, Février 2017*

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. Role of autophagy (ATG8 proteins) during Epithelial-Mesenchymal Transition of cancer cells. *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2016*

Liste des communication affichées

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. GABARAPL1 inhibits EMT through SMAD targeted degradation: a new negative feedback. *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2019 (Poster 1)*

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. GABARAPL1 restrains EMT through by inducing SMAD autophagic degradation. *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2018 (Poster 2)*

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. Characterisation of autophagic event during EMT of cancer cells. *Forum des jeunes chercheurs, Dijon, Juin 2017 (Poster 3)*

Laura Poillet-Perez, **Marine Jacquet**, Eric Hervouet, Thierry Gauthier, Annick Fraichard, Christophe Borg, Jean-René Pallandre, Bruno J Gonzalez, Yasmina Ramdani, Michaël Boyer-Guittaut, Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy. GABARAPL1 tumor suppressive function is independant of its conjugaison to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *CFATG, Paris, Novembre 2017 (Poster 4)*

Laura Poillet-Perez, **Marine Jacquet**, Eric Hervouet, Thierry Gauthier, Annick Fraichard, Christophe Borg, Jean-René Pallandre, Bruno J Gonzalez, Yasmina Ramdani, Michaël Boyer-Guittaut, Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy. GABARAPL1 tumor suppressive function is independant of its conjugaison to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *EMBO, Cavtat-Dubrovnik (Croatie), Novembre 2017 (Poster 4)*

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard, Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy. Characterization of autophagic event during EMT of cancer cells. *Journée UMR1098, Besançon, Novembre 2016 (Poster 5)*

POSTER 1 :

GABARAPL1 inhibits EMT through SMAD targeted degradation: a new negative feedback

Marine Jacquet, Jean-René Pallandre, Eric Hervouet, Jean-Paul Feugeas, Annick Fraichard,
Michaël Herf, Michaël Guittaut, and Gilles Despouy

Journées UMR1098, Besançon, France

Novembre 2019

GABARAPL1 inhibits EMT through SMAD targeted autophagy degradation: a new negative feedback

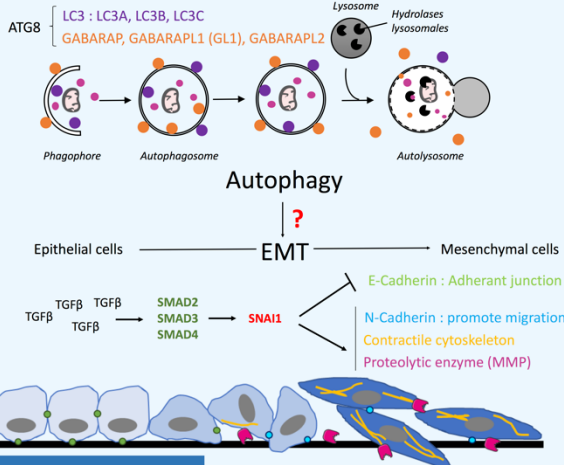
Jacquet M¹, Pallandre JR¹, Hervouet E^{1,2,3}, Fraichard A¹, Herfs M⁴, Feugas JP¹, Guittaut M^{1,2}, Despouy G¹

¹: Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France; ²: Plateforme DImaCell, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France; ³: Plateforme EPIGENExp, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France; ⁴: Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, 4000, Liege, Belgium,



Introduction

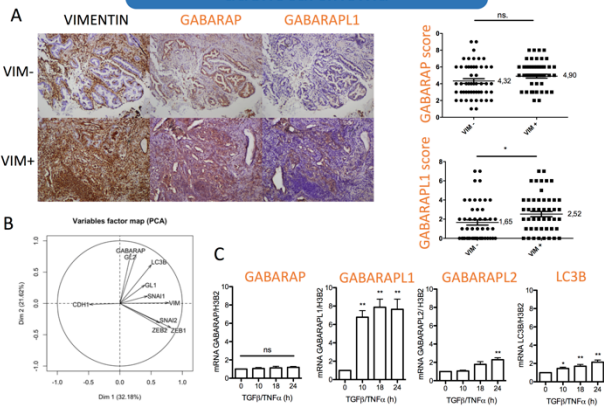
Lung cancer: most cancer-related death in human because of the high rate of metastasis. EMT play a major role during metastasis formation. Autophagy may regulate EMT.



Objectives

- 1 Expression study of ATG8 family during EMT in human lung adenocarcinoma
- 2 Role of ATG8 selective autophagy during EMT-mediated metastasis

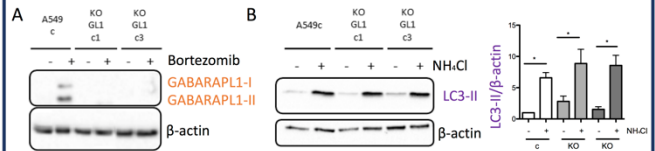
Expression of ATG8 in lung adenocarcinoma



GABARAPL1 is increased during EMT

A. Immunohistochemical of GABARAP and GABARAPL1 staining in lung adenocarcinoma tumors classified in high Vimentin staining (VIM+) and low Vimentin staining (VIM-). B. Correlations between ATG8 and EMT-related gene expression in primary lung adenocarcinoma. PCA was performed with the RNAseq data downloaded from TCGA data portal (372 samples). C. mRNA levels of GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 and LC3B were measured by qRT-PCR during 0, 10h, 18h and 24h of TGFβ (5ng/ml)/TNFα (20ng/ml)-induced EMT in A549c cells

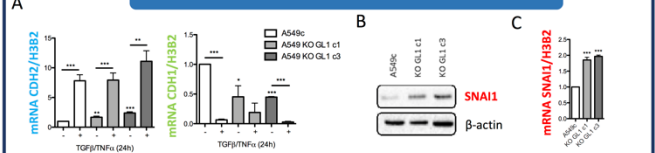
Knock out GABARAPL1 effect on autophagy flux



GABARAPL1 knock out doesn't modify autophagy flux.

A. Western blot analysis of GABARAPL1 level in A549c and KO GL1 cells untreated or treated by 50nM bortezomib for 6h. B. Western blotting analysis of LC3B level in A549c and KO GL1 cells cultured in complete medium and treated or not by 50mM NH₄Cl for 2h.

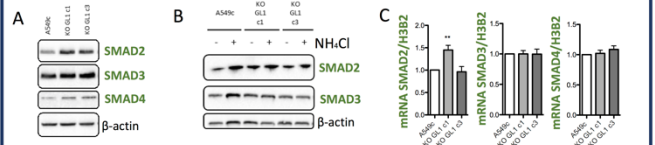
Knock out GABARAPL1 effect on EMT



GABARAPL1 knock out leads to increase of EMT

A. mRNA levels of E-Cadherin/CDH1 and N-Cadherin/CDH2 were measured by qRT-PCR in A549c and A549 KO GL1 cells untreated or treated by TGFβ (5ng/ml) and TNFα (20ng/ml) during 24h. B. Western blotting analysis of SNAI1 level in A549c and KO GL1 cells. C. mRNA levels of SNAI1 were measured by qRT-PCR in A549c and A549 KO GL1 cells.

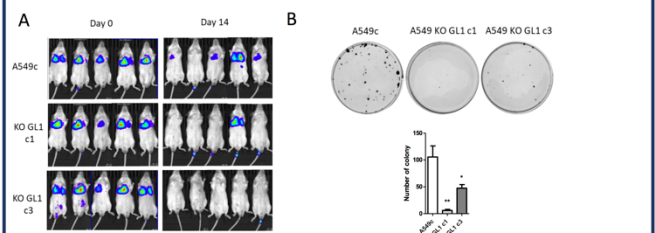
Study of SMAD expression



GABARAPL1 knock out leads to an increase of SMAD protein level by inhibiting its degradation by autophagy inducing EMT

A. Western blotting analysis of SMAD2, SMAD3 and SMAD4 level in A549c and KO GL1 cells. B. Western blotting analysis of SMAD2 and SMAD3 in A549c and KO GL1 cells untreated or treated by 50mM NH₄Cl for 2h. C. mRNA levels of SMAD2, SMAD3 and SMAD4 was measured by qRT-PCR in untreated A549c and KO GABARAPL1 cells.

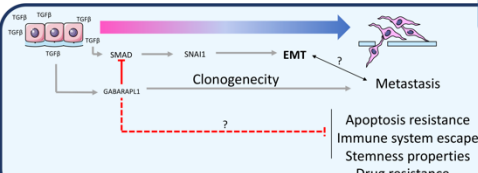
Study of metastasis formation



GABARAPL1 knock out leads to a decrease of the metastasis formation in vivo explained by a decrease of clonogenicity.

A. Metastasis formation in SCID mice injected by A549c, KO GL1 cells in the vein of the tail after 14 days. B. Clonogenic assay of A549c and KO GL1 cells

Conclusion/perspectives



- 1 Study of GABARAPL1 implication in SMAD degradation by CoIP SMAD-GABARAPL1
- 2 Determination of the which EMT transcription factor is/are involved in GABARAPL1 regulation during EMT by ChIP SMAD and/or ChIP SNAI1 analysis

POSTER 2 :

GABARAPL1 restrains EMT through by inducing SMAD autophagic degradation

. **Marine Jacquet**, Eric Hervouet, Michaël Boyer-Guittaut, Annick Fraichard and Gilles Despouy

Journées UMR1098, Besançon, France

Novembre 2019

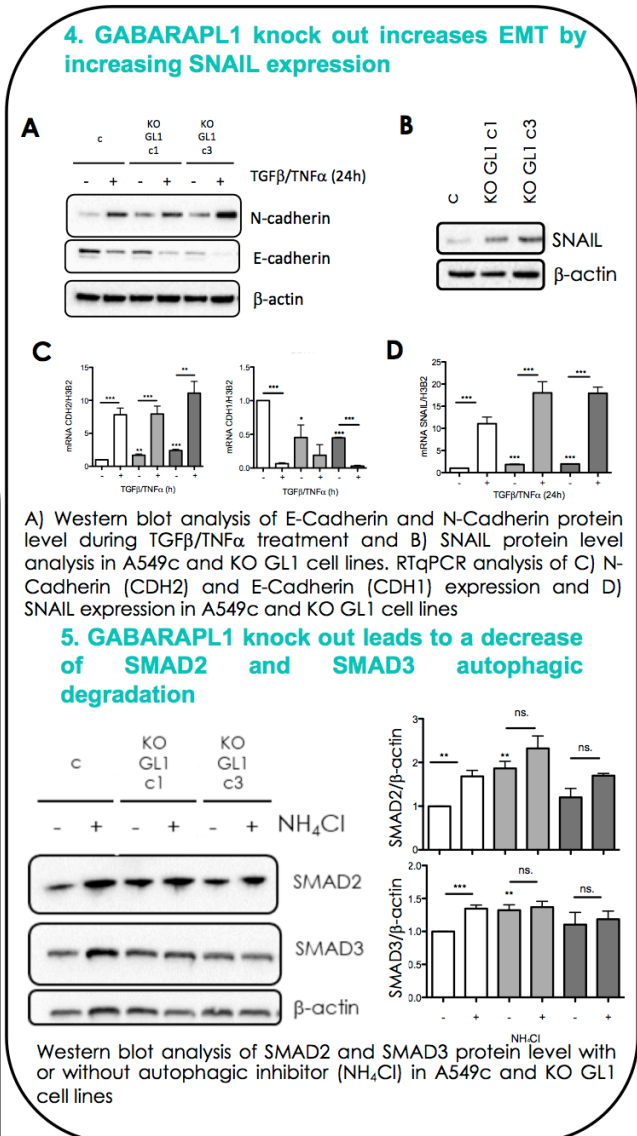
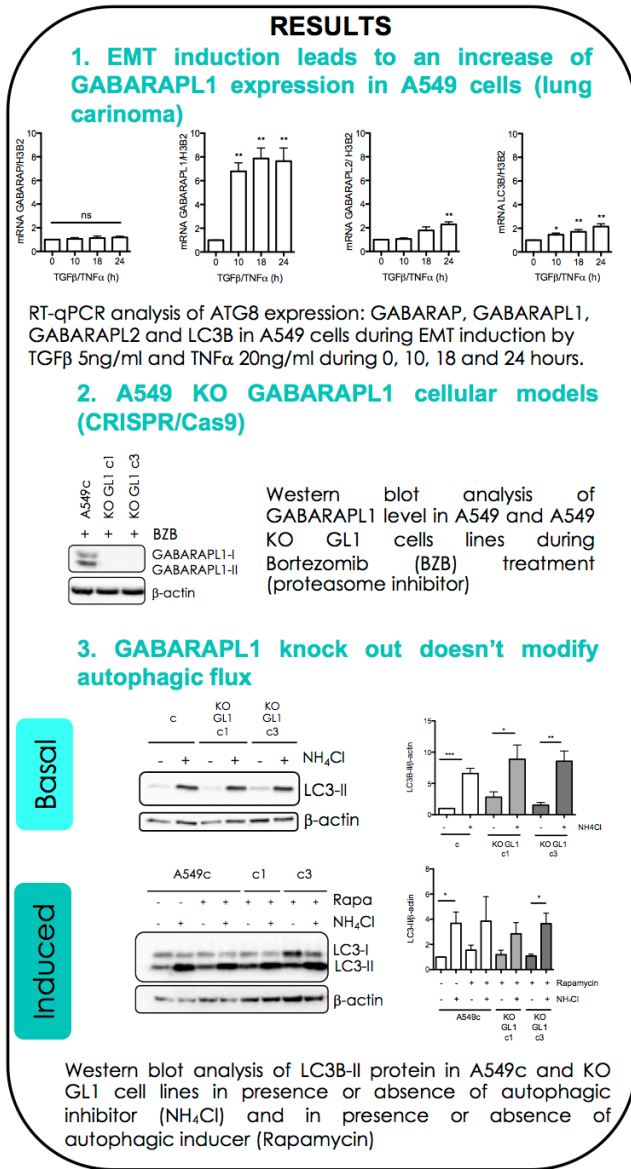
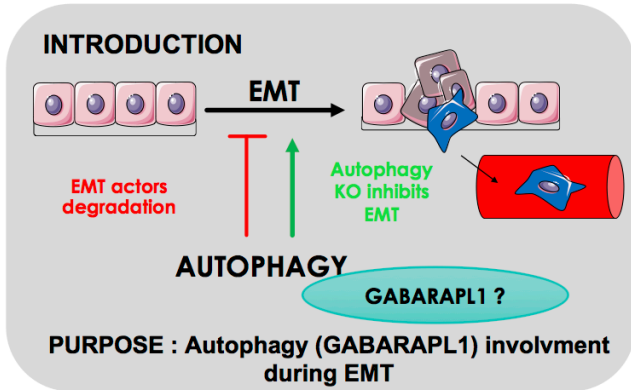
GABARAPL1 restrains Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) by inducing SMAD autophagic degradation



Marine Jacquet¹, Eric Hervouet^{1,2}, Michaël Boyer-Guittaut^{1,2}, Annick Fraichard¹, Gilles Despouy¹
¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR 1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France.



² DImaCell platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.



CONCLUSION & PERSPECTIVE

- A549 GABARAPL1 Knock out** • By CRISPR/Cas9 technology
- Decrease SMAD2/3 autophagic degradation** • Inhibition of autophagic degradation increase SMAD2/3 protein level in A549c but not in GABARAPL1 KO cells.
- Increase SNAIL expression** • Increase of SNAIL mRNA expression but not mRNA stability because of SMAD protein increase
- Increase mesenchymal cell statement = EMT** • Increase of N-cadherin and decrease of E-Cadherin (mRNA expression) because of SNAIL protein increase

- Metastasis formation will be studied by A549c and KO GL1 cell lines injection in SCID mouse (in course)
- Study if the degradation of SMAD protein is a selective autophagic degradation
- Results validation in other cell lines ACHN

POSTER 3 :

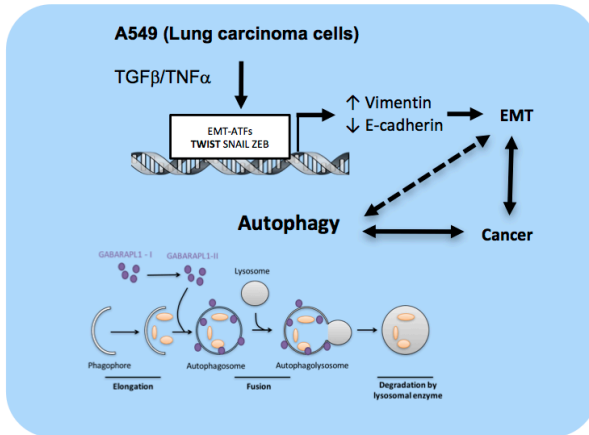
Characterisation of autophagic event during EMT of cancer cells.

Marine Jacquet, Eric Hervouet, Michaël Boyer-Guittaut, Annick Fraichard and Gilles Despouy.

Forum des jeunes chercheurs, Dijon,

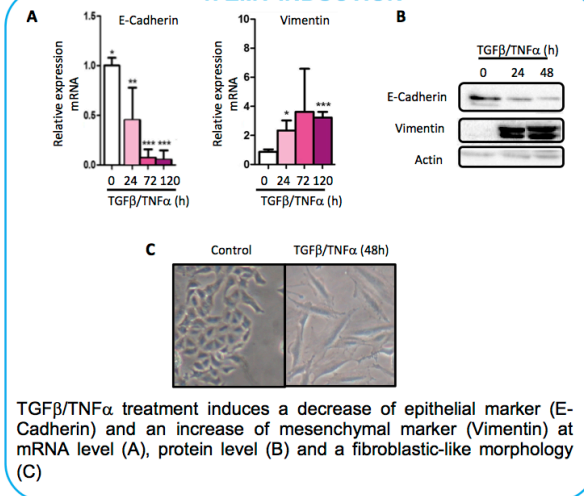
Juin 2017

INTRODUCTION

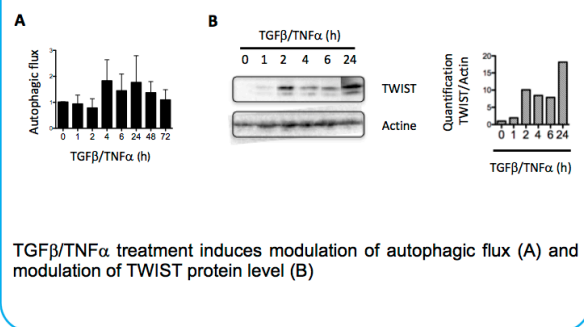


RESULTS

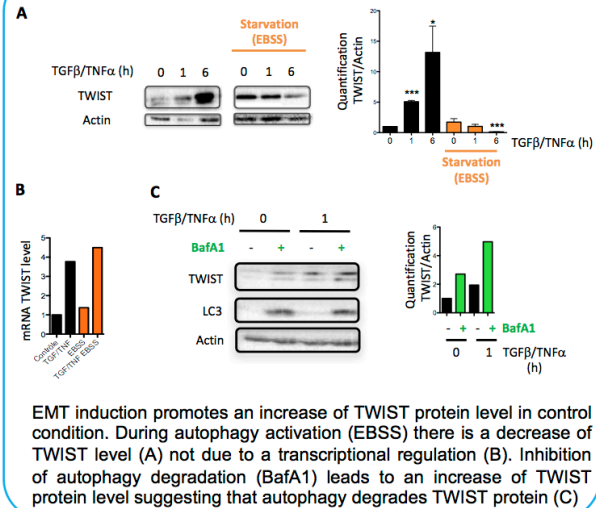
1. EMT INDUCTION



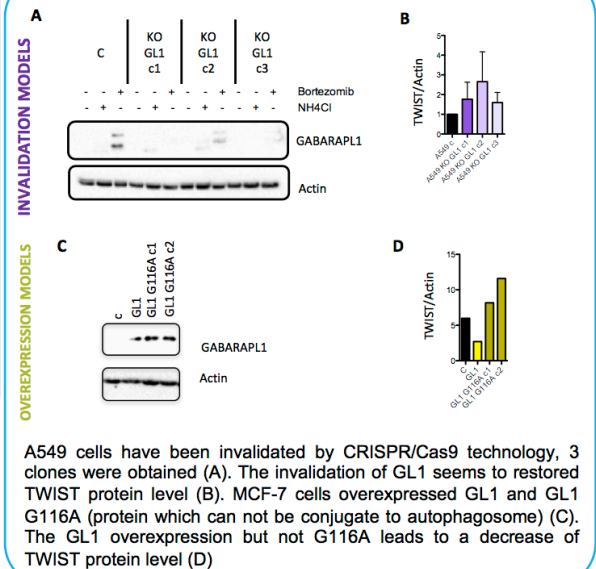
2. EMT INDUCTION EFFECT ON AUTOPHAGIC FLUX AND TWIST LEVEL



3. AUTOPHAGIC DEGRADATION OF TWIST



4. IMPLICATION OF GABARAPL1 (GL1) ON TWIST DEGRADATION



PERSPECTIVES

- Study the modulation of autophagic flux during EMT induction by analysing autophagic vesicles
- Study GL1 implication in TWIST (and other EMT-ATFs) degradation in A549, ACHN and MDA-MB-468 cells by an extinction of GL1
- Study of cancer phenotype and tumoral aggressivity of GL1^{-/-} EMT models *in vivo*

POSTER 4 :

GABARAPL1 tumor suppressive function is independant of its conjugaison to autophagosomes
in MCF-7 breast cancer cells

Laura Poillet-Perez, **Marine Jacquet**, Eric Hervouet, Thierry Gauthier, Annick Fraichard,
Christophe Borg, Jean-René Pallandre, Bruno J Gonzalez, Yasmina Ramdani, Michaël Boyer-Guittaut,
Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy.

CFATG, Paris & EMBO, Cavtat-Dubrovnik (Croatie)

Novembre 2017

GABARAPL1 TUMOR SUPPRESSIVE FUNCTION IS INDEPENDANT OF ITS CONJUGAISON TO AUTOPHAGOSOMES IN MCF-7 CANCER CELLS

Published in Oncotarget July 27, 2017

Marine Jacquet,¹ Laura Poillet-Perez,¹ Eric Hervouet,¹ Thierry Gauthier,¹ Annick Fraichard,¹ Christophe Borg,¹ Jean-René Pallandre,¹ Bruno J Gonzalez,² Yasmina Ramdani,² Michaël Boyer-Guittaut,¹ Régis Delage-Mourroux,¹ Gilles Despoux,¹

¹ « Interaction Hôte-Greffon, Tumeur et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire » UMR1098, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.

² « Microvascular Endothelium and Neonatal Brain Lesions », Inserm E.R.I 28 NeoVasc, Université de Normandie, UFR de Médecine et de Pharmacie, Rouen, France.

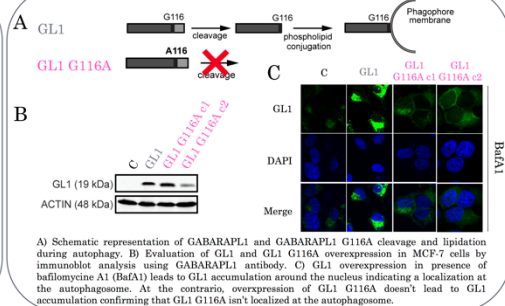
INTRODUCTION

- ❖ GABARAPL1 (GL1) is a 117 amino-acids protein belong to ATG8 family and GABARAP subfamily
- ❖ GABARAPL1 is cleaved after its C-terminal glycine (G116) to be conjugated to autophagosomes
- ❖ Extinction of GL1 leads to a decrease of autophagic flux
- ❖ GABARAPL1 is reduced in tumoral tissue compare to normal tissue
- ❖ GABARAPL1 inhibits cancer cell phenotypes *in vitro* and tumor growth *in vivo*

Purpose of the study :

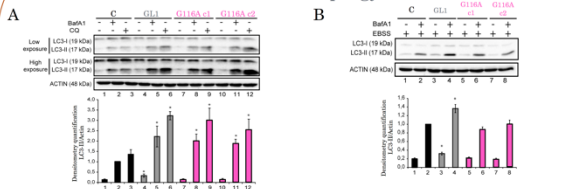
- Characterize GABARAPL1 role during autophagy
- Determine GABARAPL1 conjugation to autophagosome involvement for its tumor suppressive function

BREAST CANCER CELL MODELS

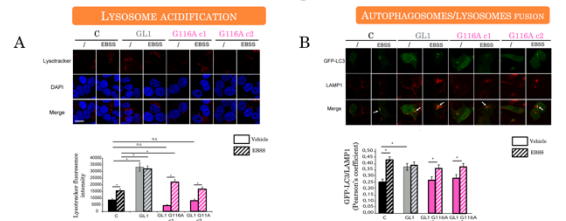


AUTOPHAGY MECHANISMS

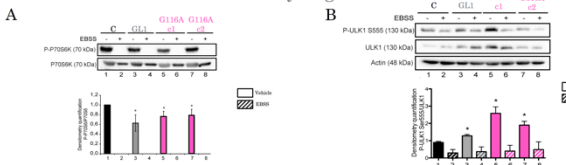
G116A mutation impairs the effect of GABARAPL1 on induced but not basal autophagy



G116A mutation impairs the GABARAPL1 effect on autophagy late stage

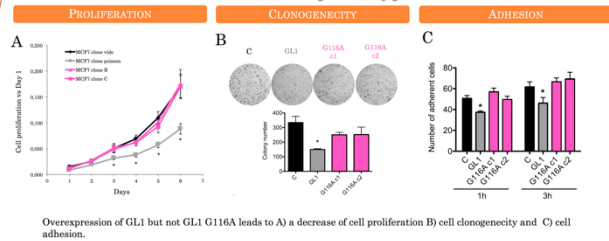


G116A mutation doesn't impair the GABARAPL1 effect on autophagy early stage

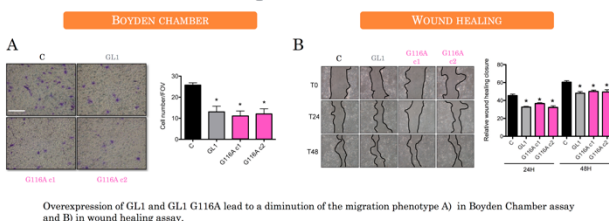


CANCER CELL PHENOTYPE

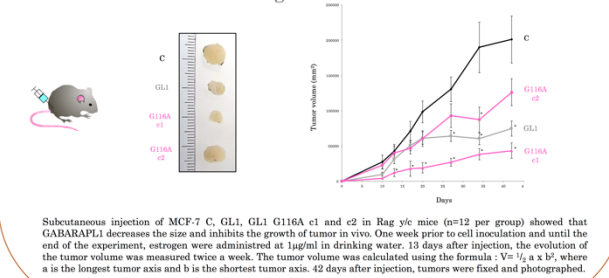
G116A mutation modifies the effect of GABARAPL1 on some cancer cell phenotype



G116A mutation doesn't modify the effect of GABARAPL1 on migration in vitro



G116A mutation doesn't modify the effect of GABARAPL1 on tumor growth in vivo

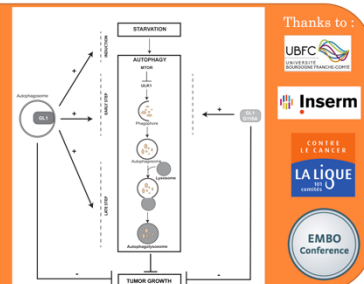


Our data allow us to show that GL1 G116A mutation :

- ❖ Does not modified the effect of GL1 on basal autophagic flux but modified its effect on induced autophagic flux
- ❖ Impairs the effect of GL1 on late stage of autophagy but did not modified its function on early stage
- ❖ Does not modified GL1 effect on some cancer phenotype *in vitro* (these results have been confirmed in BT474, another breast cancer cell line) and tumor growth *in vivo*

GABARAPL1 present different regulatory function during early and late stage of autophagy independently or not of its conjugation to autophagosomes but its tumor suppressive function appeared independent of its conjugation

CONCLUSION



Thanks to :



POSTER 5 :

Characterization of autophagic event during EMT of cancer cells

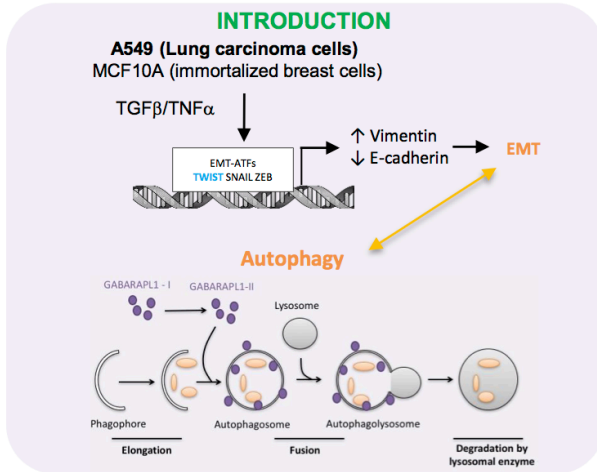
Marine Jacquet, Eric Hervouet, Régis Delage-Mourroux, Annick Fraichard and Gilles Despouy.

Journée UMR1098, Besançon

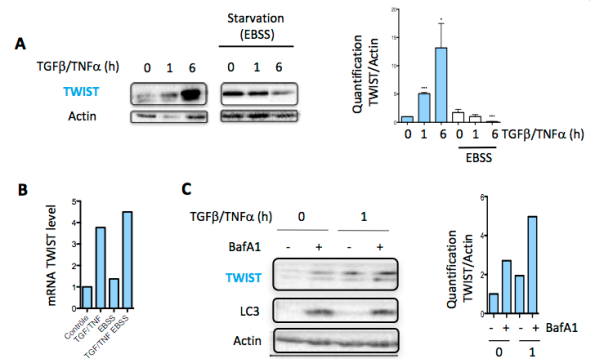
Novembre 2016

CHARACTERISATION OF AUTOPHAGIC EVENTS DURING EMT OF CANCER CELLS

Jacquet Marine¹, Hervouet Eric, Delage Mourroux Régis, Fraichard Annick, Despouy Gilles, ¹UMR1098, EA 3922, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon CEDEX, F-25030



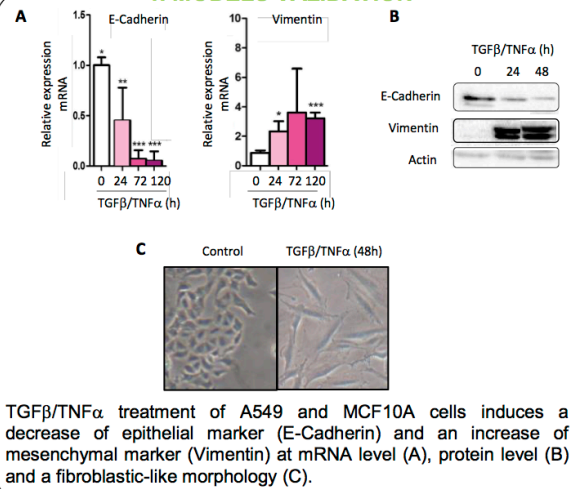
3. AUTOPHAGIC DEGRADATION OF TWIST



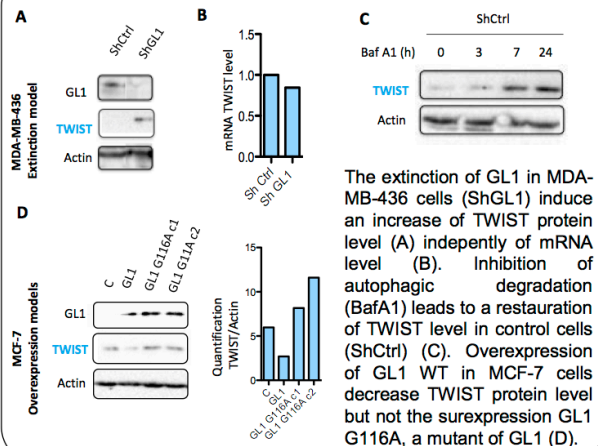
EMT induction promotes an increase of TWIST level in control condition. During autophagy activation (EBSS) there is a decrease of TWIST level (A) not due to a transcriptional regulation (B). Inhibition of autophagy degradation (BafA1) leads to an increase of TWIST level suggesting that autophagy degrades TWIST protein.

RESULTS

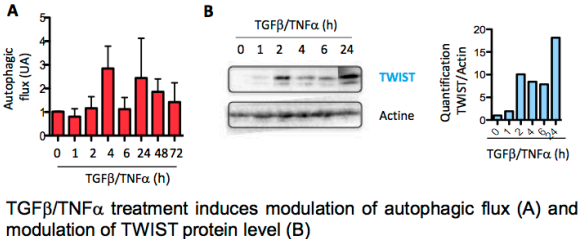
1. MODELS VALIDATION



4. IMPLICATION OF GABARAPL1 (GL1) ON TWIST DEGRADATION



2. EMT INDUCTION EFFECT ON AUTOPHAGIC FLUX AND TWIST LEVEL



PERSPECTIVES

- Study the modulation of autophagic flux by analysing autophagic vesicles
- Study GL1 implication in TWIST (and other EMT-ATFs) degradation in A549 and MCF10A cells by an extinction of GL1 by Crispr/Cas9 technology
- Study of cancer phenotype and tumoral aggressivity of GL1 -/- EMT models

Titre : Rôle de l'autophagie lors de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse des cellules cancéreuses

Mots clés : GABARAPL1, Autophagie, TEM et cancer

Résumé : L'objectif de ces travaux de thèse était d'étudier le rôle d'un mécanisme de réponse au stress, l'autophagie, et en particulier d'étudier un des acteurs de l'autophagie, GABARAPL1, lors de la progression tumorale et la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM).

GABARAPL1 appartient à la famille ATG8 et la sous-famille GABARAP dont tous les membres sont décrits comme impliqués dans le processus d'autophagie majoritairement grâce à un processus appelé lipidation et qui permet leur localisation au niveau des autophagosomes. Initialement, ces protéines avaient été décrites comme ayant des rôles redondants. Cependant, nos résultats et d'autres ont permis de mettre en évidence que les protéines ATG8 et en parti-

-culier GABARAPL1 sont également impliquées dans la régulation de l'initiation de l'autophagie.

De plus, les protéines GABARAP ont également été décrites comme dérégulées dans les cancers et comme ayant un rôle suppresseur de tumeur lié à une dégradation d'oncogènes cellulaires. De manière similaire, nous avons montré que GABARAPL1 inhiberait la TEM par son implication dans la dégradation sélective des protéines SMAD. Toutefois, nous avons également mis en évidence que GABARAPL1 inhibe la croissance tumorale indépendamment d'une dégradation par autophagie sélective.

L'ensemble de ces travaux ont permis de mettre en évidence des rôles différentiels des protéines ATG8 dans l'autophagie et le cancer malgré leur forte homologie.

Title : Role of the autophagy during Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)

Keywords : GABARAPL1, Autophagy, EMT and cancer

Abstract : The objective of this work was to study the involvement of a mechanism of stress response, the autophagy and in particular one of the autophagy actor's, GABARAPL1 during tumor progression and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT).

GABARAPL1 belongs to the ATG8 family and to the GABARAP subfamily which are all involved in the autophagy process thanks to a process commonly called lipidation which permits the localization of the proteins to the autophagosome membrane.

Firstly, these proteins have been described to have redundant function. However, thank to our work and other, we demonstrate that the ATG8 proteins and in particular GABARAPL1, are involved in the regulation of the initiation of the

autophagy.

Moreover, the GABARAP proteins have been described to be dysregulated during cancer and to have a tumor suppressive function thank to their implication in the degradation of cellular oncogene by selective autophagy. Similarly, we found that GABARAPL1 might inhibit EMT through its implication in the selective degradation of SMAD proteins. However, we have also shown that GABARAPL1 can inhibit tumor growth independently of a selective degradation by the autophagy.

This work has highlighted that the ATG8 proteins, despite their high homology can have differential roles in autophagy and cancer.