



**HAL**  
open science

# Implication des septines recrutées sur les microtubules tyrosinés et polyglutamylés dans la résistance au taxol de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231

Laurence Froidevaux-Klipfel

► **To cite this version:**

Laurence Froidevaux-Klipfel. Implication des septines recrutées sur les microtubules tyrosinés et polyglutamylés dans la résistance au taxol de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114850 . tel-00656975

**HAL Id: tel-00656975**

**<https://theses.hal.science/tel-00656975>**

Submitted on 5 Jan 2012

**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.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE*

## DISCIPLINE :

Physiopathologie cellulaire et moléculaire

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N°1125

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 14/12/2011

par

**Laurence FROIDEVAUX-KLIPFEL**

**IMPLICATION DES SEPTINES RECRUTEES SUR LES MICROTUBULES  
TYROSINES ET POLYGLUTAMYLES DANS LA RESISTANCE AU TAXOL  
DE CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES MDA-MB 231**

**Directeur de thèse :** Professeur Bruno BAUDIN, EA4530, Université Paris-Sud 11

**Co-directeur de thèse :** Docteur Anita BAILLET, EA4530, Université Paris-Sud 11

**Composition du jury :**

*Rapporteurs :* Professeur Charles DUMONTET, CRCL /INSERM U1052 - CNRS UMR 5286, Université Lyon I  
Docteur Pascal VERDIER-PINARD, CRCM /INSERM UMR 891, Université Aix-Marseille II

*Examineurs :* Docteur Carsten JANKE, CNRS UMR 3306, Institut Curie Orsay, Université Paris-Sud 11  
Docteur Laurence LAFANECHERE, INSERM/ UJF823, Institut Albert Bonniot, Université Grenoble I  
Professeur Bruno BAUDIN, EA4530, Université Paris-Sud 11  
Docteur Anita BAILLET, EA4530, Université Paris-Sud 11



## REMERCIEMENTS

Ca y est... voilà un « truc de plus en moins à faire » ! Maintenant que mon manuscrit est rédigé, je peux enfin remercier toutes les personnes sans qui cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est aujourd'hui...

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Charles Dumontet et le Docteur Pascal Verdier-Pinard pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, et pour leur lecture très attentive du manuscrit. Je souhaite également remercier les autres membres du jury, le Docteur Carsten Janke, le Docteur Laurence Lafanechère, et mes directeurs de thèse, le Professeur Bruno Baudin et le Docteur Anita Baillet, pour avoir accepté d'être examinateurs du travail ici présenté.

J'aimerais remercier le Professeur Christian Pouïs, directeur du laboratoire, ainsi que le Professeur Bruno Baudin, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance en me sélectionnant pour ce sujet de thèse. Merci à Christian pour son aide précieuse, pour la bibliothèque d'articles qu'il a toujours en tête, mais aussi pour sa passion de la science, son humour et son enthousiasme. J'aimerais également remercier le Professeur Geneviève Durand, anciennement directrice du laboratoire, présente dans le jury de sélection de l'Ecole Doctorale, qui m'a permis d'obtenir une allocation de recherche pour cette thèse.

Je souhaite témoigner toute ma gratitude au Docteur Anita Baillet, co-directrice de ma thèse, pour laquelle je suis infiniment reconnaissante, pour son excellent encadrement et sa grande disponibilité (malgré sa quantité d'enseignements), sans oublier son aide pour la rédaction de ce manuscrit. Un grand merci pour tout, pour m'avoir appris tant de choses (et même jusqu'à reconnaître quelques champignons), pour m'avoir remonté le moral dans les moments de doute, pour m'avoir aidé à surmonter le stress de la fin de thèse, sans oublier les bons moments partagés, les fous-rires des pauses thé/chocolat ou pendant la rédaction (quand on arrivait à dire la même chose en même temps, en disant souvent n'importe quoi), et pour m'avoir si souvent ramené chez moi (même quand j'avais oublié que j'étais venue en voiture le matin même...).

Je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle Cantaloube, une technicienne « exceptionnelle », non seulement pour son aide précieuse et son efficacité redoutable en manip, mais aussi pour sa gentillesse, son soutien et sa bonne humeur continuelle (et qui nous fait souvent découvrir de super marques de vêtements...). Je tiens également à remercier Ingrid Leroy-Gori, qui est capable de passer des heures dans le noir au microscope à filmer des cellules, ce qui m'a aussi beaucoup aidé dans les manips, mais surtout pour m'avoir beaucoup fait rire en tant que voisine de bureau et au déjeuner.

Si je continue avec les voisins de bureau, c'est au tour de Rafah Mackeh, une doctorante libanaise, que je remercie pour sa gentillesse et pour notre complicité. Un grand merci pour nous avoir fait



découvrir la cuisine libanaise (surtout les pâtisseries ramenées directement du Liban !), et pour toutes les « questions que tu demandes », les « astuces récoltées de voyage » et autres expressions inoubliables qui nous font tellement rire. Je garde précieusement le reste de la liste pour sa thèse, qui va arriver bien trop vite, et lui souhaite bon courage pour la suite!!

Merci à Ameetha Ratier, une petite indienne réservée mais malicieuse, qui a une fâcheuse tendance à souvent répéter tout ce qu'on dit, et à se cacher dans les placards quand elle est au téléphone.

Je remercie aussi Camille Geeraert, une ancienne thésarde du labo (un modèle de réussite à suivre !), pour son enthousiasme contagieux, et pour son post-it d'encouragements qui est toujours sur mon bureau depuis son départ.

Je tiens aussi à remercier Antoine Pilon, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son humour au troisième degré. Je remercie aussi Arnaud Bruneel, qui partage maintenant le bureau d'Antoine (pour mieux se chamailler pour savoir qui a le plus beau téléphone portable), mais surtout pour l'intérêt qu'il a souvent témoigné pour mon travail, également pour ses précieux conseils et la lecture critique de mon article, mais aussi pour sa bonne humeur et son humour continuel. Par la même occasion, je remercie Florence Habarou, qui a fait son stage de Master2 avec Arnaud, et dont on attend le retour pour le début de sa thèse, et que je remercie pour sa gentillesse et sa grande sérénité.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire pour leur aide, leur disponibilité et leur bonne humeur, qu'ils soient fraîchement arrivés, présents depuis quelques années ou déjà repartis : Najet Charef, pour sa gentillesse et pour m'avoir beaucoup aidé dans la préparation de mes enseignements, Béatrice Benoît, fraîchement arrivée au laboratoire cette année et qui marque déjà par son humour et sa gentillesse, Daniel Perdiz, Séverine Lorin, Philippe Billiald, Claude Mariette, Christelle Leroux, Mariama Diallo, Elisabeth Bugnard, Pascal Rigolet, sans oublier les anciens thésards et ATER Julien Gustiniani, toujours plein d'humour, Vanessa Daire et Stéphanie Drevensek, ainsi que tous les stagiaires qui sont passés par le « D4-1<sup>er</sup> » depuis mon arrivée, et notamment Hayat Ahmed-Zaïd, une étudiante de Master2 qui a travaillé sur une partie de mon projet de thèse avec Anita, et à qui je dois tous les résultats de PCR quantitative. Je tiens également à remercier Marie Lemaître, non seulement pour les énormes boîtes de chocolats qu'elle nous apporte à Noël et à Pâques, mais surtout pour le temps qu'elle a consacré à l'établissement de la lignée cellulaire MDA-MB résistante au Taxol lorsqu'elle était technicienne au laboratoire. Et merci à Ronan Crépin pour m'avoir « cédé » son sujet de stage de Master2, ce qui m'a permis d'être ici aujourd'hui.

Par ailleurs, ce travail de thèse a débuté en grande partie à la plateforme Protéomique (toute ma première année !). Je tiens ainsi à remercier tout particulièrement Céline Boursier, pour m'avoir accueillie régulièrement dans son labo, et pour m'avoir formé aux techniques de protéomiques, et notamment aux gels 2D, et même fait des manip pour moi, et je remercie énormément Florence Poirier, qui est venu soutenir l'activité de la plateforme pendant 2 ans, et pour m'avoir formé à

l'analyse par spectrométrie de masse et à l'analyse d'image. Je les remercie toutes les deux pour leur grande disponibilité et leur gentillesse. Je remercie également Christophe Marchand, pour sa disponibilité à analyser mes échantillons au MALDI-TOF à Orsay.

De même, je tiens à remercier Claudine Deloménie, de la plateforme Transcriptome, pour le temps qu'elle a consacré à Hayat pour les analyses de PCR quantitatives, et Valérie Nicolas, de la plateforme Imagerie, pour sa gentillesse et pour m'avoir tant de fois prêté la platine chauffante.

Je n'oublierai évidemment pas de remercier mes cellules MDA-MB Tv et surtout les T8, pour ne pas m'avoir laissé tomber dans les moments critiques, et surtout lorsque j'ai cru que j'allais définitivement les perdre. Pour avoir survécu (et mûri uniquement quand je vous le demandais...), merci !

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude à mes précédents maîtres de stage, Georges Da Violante et Frédéric De Ceuninck, ainsi qu'à Madame Odile Sella, un professeur de l'Ecole de Biologie Industrielle, pour m'avoir conseillé et encouragé à poursuivre en thèse.

Je n'ai pas encore tout à fait fini de remercier mon entourage. Evidemment, tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille et de mes amis, qui ont tous compris à quel point c'était important pour moi.

La première personne que j'aimerais remercier du fond du cœur est mon cher et tendre Gilles, que j'ai eu le bonheur d'épouser pendant la thèse, sans qui les difficultés de la thèse auraient été bien plus difficiles à supporter (et je ne sais pas si j'y serai arrivée). Merci de m'avoir encouragée à me dépasser chaque jour, et d'avoir supporté mes horaires aussi chargés au labo et les soirées si courtes ensemble. Merci à mes beaux-parents de ne pas m'avoir reproché de ne pas m'être assez occupé de leur fils. Et merci à mon petit chaton roux, pour sa douceur et son réconfort (et pour ses séances d'ostéopathie).

J'aimerais aussi remercier tout particulièrement mes amis les plus proches, qui ont toujours été à mes côtés, et qui m'ont permis de décompresser de temps en temps. Un grand Merci aux amis de l'EBI, qui seront les seuls à espérer comprendre quelques lignes de mon travail... et Merci aussi à tous les autres amis, qui se demandent probablement comment on peut rédiger autant de pages avec autant de mots compliqués sur quelque chose qu'on ne voit même pas à l'œil nu...

J'aimerais enfin remercier infiniment mes parents, mon frère Pierre ainsi que le reste de la famille, pour m'avoir encouragé, soutenu et supporté pendant ces quatre ans de thèse, après déjà cinq ans d'école d'ingénieur, mais aussi pour avoir enfin compris au bout de toutes ces années d'études que je ne fabriquais pas de médicaments !

Papy n'a jamais su que je poursuivrais en thèse, il aurait aimé lire ce manuscrit. Je lui dédie fièrement.



## LISTE DES ABREVIATIONS

Ne sont répertoriées que les abréviations fréquemment employées dans le texte. Celles employées une seul fois sont explicitées dans le texte uniquement.

2-DE	Electrophorèse bidimensionnelle
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
ADNc	Brin complémentaire d'ADN
ARN	Acide Ribo Nucléique
BCA	Acide Bicinchoninique
BET	Bromure d'Ethidium
BSA	Bovine Serum Albumine
CCP	Cytosolic Carboxypeptidase
CENP-E	Centromere-associated Protein E
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHCA	Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
CLASP	CLIP Associated Protein
CLIP-170	Cytoplasmic Linker Protein-170
Cy5	Cyanine 5
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Mélange de désoxyribonucléotides
DTT	1,4-Dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
FCF	ForChlorFenuron
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
KIF	KInesin superFamily protein
IC <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice à 50%
IP	Iodure de Propidium

IPG	Gradient de pH immobilisé
LC-MS/MS	Liquid chromatography – tandem mass spectrometry
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MAP	Microtubule Associated Protein
MCAK	Mitotic Centromere-Associated Kinesin
MDR	Multi-Drug Resistance
MRP	MultiResistance-associated Protein
MT	Microtubule
MTT	Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium
P-gp	P-glycoprotéine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEM	Tampon Pipes/EGTA/MgCl <sub>2</sub>
pI	Point Isoélectrique
PFA	Paraformaldéhyde
PM	Tampon Pipes/MgCl <sub>2</sub>
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
s.e.m.	Ecart Standard à la Moyenne
siRNA	Small Interfering RiboNucleic Acid
SRB	Sulforhodamine B
SVF	Sérum de Veau Foetal
T8	8 <sup>ème</sup> palier de résistance au Taxol
TBS	Tris Buffered Saline
TFA	Acide TrifluoroAcétique
TOF	Time Of Flight
TRITC	Tétra méthyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
TTBS	Tween Tris Buffered Saline
TTCP	Tubuline Tyrosine CaboxyPeptidase
TTL	Tubuline Tyrosine Ligase
TTLL	Tubuline Tyrosine Ligase Like
Tv	Témoin Vérapamil
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### ◆ Liste des Tableaux :

Tableau I : Transcrits et isoformes des gènes et pseudogènes de septines humaines.....	69
Tableau II : Interaction des septines de mammifères avec le cytosquelette de microtubules .....	87
Tableau III : Caractéristiques des septines humaines et pathologies associées.....	93
Tableau IV : Nomenclature de SEPT9 .....	97
Tableau V : Composition du milieu de culture .....	126
Tableau VI : Plasmides utilisés pour les transfections .....	129
Tableau VII : siRNA utilisés pour les transfections.....	130
Tableau VIII : Anticorps utilisés en immunofluorescence.....	133
Tableau IX : Composition du Mowiol.....	134
Tableau X : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés .....	134
Tableau XI : Composition des tampons de perméabilisation et de dépolymérisation.....	138
Tableau XII : Composition du tampon de lyse.....	140
Tableau XIII : Gamme de Taxol .....	141
Tableau XIV : Composition du tampon échantillon concentré 4X .....	143
Tableau XV : Composition des tampons utilisés pour le SDS-PAGE .....	143
Tableau XVI : Composition des gels utilisés pour le SDS-PAGE .....	144
Tableau XVII : Composition du tampon utilisé pour l'électrotransfert .....	144
Tableau XVIII : Composition des tampons utilisés pour l'immunomarquage.....	145
Tableau XIX : Anticorps utilisés en Western Blot.....	146
Tableau XX : Composition du tampon de solubilisation des échantillons.....	153
Tableau XXI : Composition de la solution de solubilisation.....	154
Tableau XXII : Programmes d'IEF.....	155
Tableau XXIII : Composition du tampon d'équilibration.....	155
Tableau XXIV : Composition du gel de deuxième dimension.....	156
Tableau XXV : Composition du tampon d'électrophorèse.....	156
Tableau XXVI : Programme de migration de la deuxième dimension .....	156
Tableau XXVII : Composition de la solution d'extraction.....	158
Tableau XXVIII : Données fixées pour Mascot Peptide Mass Fingerprint.....	160
Tableau XXIX : Données fixées pour Mascot MS/MS Ion Search.....	162
Tableau XXX : Protéines différenciellement exprimées et enrichies dans la fraction microtubulaire des cellules sensibles et résistantes au Taxol.....	182
Tableau XXXI : Variation des Ct moyens des gènes de septines chez les cellules sensibles Tv et résistantes T8.....	191

Tableau XXXII : Variation des Ct moyens des gènes d'enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline chez les cellules sensibles et résistantes ..... 214

Tableau XXXIII : Données des mesures de Vitesses de polymérisation des microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8 en présence ou en absence de Taxol ..... 244

◆ **Liste des Figures :**

Figure 1 : Le cytosquelette cellulaire .....	21
Figure 2 : Les différentes phases de la division cellulaire.....	22
Figure 3 : Structure d'un microtubule et de ses sous-unités.....	27
Figure 4 : Les différentes organisations (lattices) du microtubule .....	28
Figure 5 : Modifications post-traductionnelles de la tubuline.....	32
Figure 6 : Mécanismes de polyglutamylation et déglutamylation.....	38
Figure 7 : La famille des TLLs .....	39
Figure 8 : Préférences réactionnelles et de substrat des 13 TLLs connues .....	40
Figure 9 : Mécanisme de déglutamylation .....	42
Figure 10 : Localisation des modifications post-traductionnelles de l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline et enzymes impliquées dans la polyglutamylation et dans le cycle de tyrosination/détyrosination.....	44
Figure 11 : Les deux superfamilles de moteurs moléculaires, dynéine et kinésine.....	45
Figure 12 : Complexe $\gamma$ -TuRC et Nucléation centrosomale.....	50
Figure 13 : Instabilité dynamique des microtubules et treadmilling .....	53
Figure 14 : Photographie en microscopie électronique d'un bourgeon de <i>S. cerevisiae</i> indiquant la présence de septines au niveau des filaments de l'anneau contractile.....	68
Figure 15 : Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines .....	70
Figure 16 : Domaines fonctionnels des septines chez les mammifères.....	71
Figure 17 : Modèle ruban de l'assemblage de SEPT2-315 en dimères G et NC.....	73
Figure 18 : Composition des complexes de septines chez <i>C. elegans</i> et <i>S. cerevisiae</i> .....	74
Figure 19 : Structure d'un hétéro-trimère de septines de mammifères.....	75
Figure 20 : Compositions d'hétéro-trimères possibles de septines chez les mammifères.....	77
Figure 21 : Assemblages possibles des hétéro-tétramères de septines.....	78
Figure 22 : Modèle d'assemblage dynamique des septines au niveau de l'anneau contractile chez la levure.....	79
Figure 23 : Assemblage des complexes de septines en structures d'ordre supérieur chez les mammifères.....	80
Figure 24 : Schéma hypothétique de régulation spatiale par les septines des interactions entre les microtubules et les MAPs et les moteurs .....	92
Figure 25 : Structure génomique des transcrits et variants de <i>SEPT9</i> .....	96
Figure 26 : Structure chimique des agents déstabilisateurs et stabilisateurs des microtubules .....	105

Figure 27 : Les différents sites de liaison à la tubuline des agents ciblant les microtubules.....	106
Figure 28 : Arrêt de la mitose par le checkpoint du fuseau mitotique suite à une exposition au Taxol .....	112
Figure 29 : Paliers de résistance au Taxol.....	127
Figure 30 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	135
Figure 31 : Construction de kymographes.....	136
Figure 32 : Extraction cytosol et microtubules totaux.....	137
Figure 33 : Vérification de la qualité de l'extraction des microtubules totaux .....	139
Figure 34 : Deux anticorps reconnaissant spécifiquement la polyglutamylation de la tubuline selon la longueur de la chaîne latérale .....	148
Figure 35 : Premiers cycles d'une PCR .....	151
Figure 36 : Structure d'un spectromètre de masse .....	158
Figure 37 : Source d'ionisation MALDI.....	160
Figure 38 : Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	161
Figure 39 : Cytotoxicité comparée du Taxol dans les cellules MDA-MB Tv et T8 .....	170
Figure 40 : Augmentation de la quantité de tubuline polymérisée dans les cellules résistantes au Taxol .....	170
Figure 41 : Surexpression des isotypes III et IV de $\beta$ -tubuline dans les fractions microtubulaires de cellules MDA-MB 231 résistantes au Taxol .....	171
Figure 42 : Quantification du pic sub-G1 du cycle cellulaire des cellules sensibles et résistantes .....	172
Figure 43 : Modification du recrutement de la survivine et de P53 sur les microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8 .....	173
Figure 44 : Cartographie protéomique comparative d'extraits microtubulaires de cellules Tv et T8..	179
Figure 45 : Représentation graphique à secteurs des fonctions des protéines péri-microtubulaires identifiées .....	181
Figure 46 : Analyse comparative par Western blot de lysats et d'extraits subcellulaires de cellules sensibles Tv et résistantes T8 au Taxol .....	188
Figure 47 : Variation de la quantité des transcrits de septines dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8.....	191
Figure 48 : Localisation subcellulaire différentielle de SEPT2 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8.....	196
Figure 49 : Localisation subcellulaire différentielle de SEPT9 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8.....	196
Figure 50 : Organisation des complexes de septines dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8 en présence de cytochalasine B.....	198
Figure 51 : Localisation subcellulaire des septines en absence de microtubules dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8 .....	200
Figure 52 : Localisation subcellulaire des septines en présence de Taxol dans les cellules sensibles Tv .....	201
Figure 53 : Effet de l'inhibition partielle de l'expression d'une septine sur le recrutement sur les microtubules des septines des autres groupes .....	202



Figure 54 : Absence de localisation microtubulaire de SEPT2 par inhibition partielle de SEPT2 et SEPT11 par siRNA dans les cellules résistantes T8.....	204
Figure 55 : Effet de l'inhibition partielle des septines par siRNA sur la sensibilité au Taxol de cellules sensibles Tv et résistantes T8 .....	206
Figure 56 : Cytotoxicité comparée du Taxol dans les cellules MDA-MB Tv et T8 après inhibition partielle des septines par siRNA .....	207
Figure 57 : Recrutement de SEPT2 sur les microtubules polyglutamylés des cellules résistantes T8	210
Figure 58 : Niveaux d'accumulation des modifications post-traductionnelles de tubuline dans les fractions cytosoliques et microtubulaires des cellules Tv et T8.....	212
Figure 59 : Niveaux d'accumulation de tubuline polyglutamylée dans les fractions cytosoliques et microtubulaires des cellules Tv, Tv traitées au Taxol et T8.....	214
Figure 60 : Variation de la quantité des transcrits d'enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline dans les cellules Tv et T8.....	216
Figure 61 : Inhibition partielle de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline par siRNA TTL mais pas par siRNA TTLL1.....	218
Figure 62 : Restauration de la sensibilité au Taxol de cellules résistantes par inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase par siRNA.....	219
Figure 63 : Influence d'une surexpression de déglutamylases sur l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline sur les microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8.....	220
Figure 64 : Restauration de la sensibilité au Taxol de cellules résistantes par surexpression de la déglutamylase CCP5 .....	222
Figure 65 : Désorganisation partielle de SEPT2 par surexpression de la déglutamylase CCP5 dans les cellules résistantes T8.....	223
Figure 66 : Influence d'une inhibition partielle des septines par siRNA sur l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline.....	224
Figure 67 : Influence de l'inhibition partielle de certaines enzymes responsables des niveaux de polyglutamylation et tyrosination de la tubuline sur l'expression des septines.....	226
Figure 68 : Influence d'une surexpression de déglutamylases sur l'expression des septines.....	228
Figure 69 : Degré de polyglutamylation des microtubules des cellules sensibles et résistantes .....	230
Figure 70 : Influence d'une surexpression d'enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline sur l'expression des modifications post-traductionnelles de tubuline ....	232
Figure 71 : Instauration d'une résistance au Taxol de cellules sensibles par surexpression de la polyglutamylase TTLL5.....	234
Figure 72: Influence de la surexpression de polyglutamylases et de tubuline tyrosine ligase sur l'accumulation des septines dans les fractions microtubulaires des cellules Tv et T8.....	236
Figure 73 : Perturbation de la localisation de SEPT2 par surexpression des polyglutamylases TTLL5 et TTLL11 et de la tubuline tyrosine ligase TTL dans les cellules sensibles Tv .....	238
Figure 74 : Vitesse de croissance des microtubules des cellules Tv et T8 en absence et en présence de Taxol.....	244
Figure 75 : Diminution du recrutement de MAP4 sur les microtubules des cellules résistantes T8...	246
Figure 76 : Absence de colocalisation entre MAP4 et SEPT2 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8.....	247

Figure 77 : Augmentation du recrutement de CLIP-170 sur les microtubules des cellules résistantes T8 .....	247
Figure 78 : Augmentation du recrutement de MCAK sur les microtubules des cellules résistantes...	248
Figure 79 : Mécanisme hypothétique de résistance au Taxol des cellules MDA-MB 231 impliquant les septines et la polyglutamylation/tyrosination de la tubuline pour une restauration partielle de la dynamique microtubulaire.....	259



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	1
LISTE DES ABREVIATIONS .....	3
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES .....	9
SOMMAIRE .....	15
AVANT-PROPOS .....	17
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>17</b>
<b>PARTIE I : LES MICROTUBULES.....</b>	<b>19</b>
<b><i>I. Le cytosquelette cellulaire .....</i></b>	<b>19</b>
I.1. Les filaments intermédiaires .....	19
I.2. Les filaments d'actine .....	20
I.3. Les microtubules .....	20
<b><i>II. Microtubules et Vie Cellulaire .....</i></b>	<b>21</b>
II.1. Cellule en mitose.....	21
II.2. Cellule en apoptose.....	23
II.2.1. Apoptose .....	23
II.2.2. Microtubules et apoptose .....	23
II.2.2.1. Protéines de la famille de Bcl-2 .....	23
II.2.2.2. La survivine.....	24
II.2.2.3. Apoptose induite par des substances ayant un effet sur les microtubules.....	24
II.3. Cellule en Interphase.....	25
II.3.1. Maintien de l'architecture intracellulaire.....	25
II.3.2. Trafic intracellulaire.....	25
II.3.3. Transduction du signal.....	26
<b><i>III. Structure et Composition des Microtubules.....</i></b>	<b>27</b>
III.1. Structure générale.....	27
III.2. Composition .....	29
III.2.1. Les tubulines $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\zeta$ et $\eta$ .....	29
III.2.2. Les tubulines $\alpha$ et $\beta$ .....	29
III.3. Domaines fonctionnels.....	30
III.4. Polymorphisme .....	30
III.4.1. Hétérogénéité de la tubuline.....	30
III.4.2. Polymorphisme génétique de la tubuline.....	30
III.4.3. Polymorphisme lié aux modifications post-traductionnelles de la tubuline.....	31
III.4.3.1. Phosphorylation .....	32
III.4.3.2. Palmitoylation .....	33
III.4.3.3. Acétylation .....	33
III.4.3.4. Le cycle de Détyrosination/ Tyrosination .....	34
III.4.3.5. Nitrotyrosination.....	35
III.4.3.6. Polyglycylation.....	35
III.4.3.7. Polyglutamylatation.....	35
III.4.4. Les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles de la tubuline.....	37
III.4.4.1. La Tubuline Tyrosine Ligase .....	37
III.4.4.2. Les Tubuline Tyrosine Ligases-Like, des polyglutamylases .....	37
III.4.4.3. Les Cytosolic CarboxyPeptidases, des déglutamylases.....	42
III.5. Protéines Associées aux Microtubules .....	44
III.5.1. Les MAPs Structurales .....	44
III.5.2. Les MAPs Motrices ou Moteurs moléculaires .....	45
III.5.2.1. Les kinésines, un trafic vers la périphérie cellulaire .....	46
III.5.2.2. Les dynéines, un trafic en direction du noyau.....	47
III.5.3. Les « + end Tracking Proteins » .....	48
<b><i>IV. Dynamique Microtubulaire et Régulation .....</i></b>	<b>49</b>
IV.1. Nucléation .....	49
IV.1.1. Nucléation centrosomale.....	49
IV.1.2. Nucléation extra-centrosomale .....	50
IV.2. Dynamique microtubulaire.....	51

IV.2.1.	La concentration critique en tubuline.....	51
IV.2.2.	Le treadmilling.....	51
IV.2.3.	L'instabilité dynamique.....	51
IV.2.4.	Cycle de vie des microtubules <i>in vivo</i> .....	53
IV.3.	Régulation de la dynamique microtubulaire.....	54
IV.3.1.	Protéines stabilisatrices.....	54
IV.3.1.1.	Tau.....	55
IV.3.1.2.	MAP2.....	55
IV.3.1.3.	MAP4.....	56
IV.3.1.4.	MAP1.....	56
IV.3.1.5.	Les autres MAPs.....	57
IV.3.2.	Protéines déstabilisatrices.....	58
IV.3.2.1.	Les MARKs.....	58
IV.3.2.2.	L'oncoprotéine18 /Stathmine.....	58
IV.3.2.3.	La Katanine.....	58
IV.3.2.4.	La Mapmoduline.....	59
IV.3.2.5.	La protéine MINUS.....	59
IV.3.2.6.	La famille des kinésine-13.....	59
IV.4.	Spécialisation fonctionnelle des microtubules.....	59
IV.4.1.	Microtubules stables et dynamiques.....	59
IV.4.2.	Rôle dans le trafic intracellulaire.....	60
IV.4.3.	Maintien de la cohésion des organites.....	61
IV.4.4.	Migration cellulaire.....	61
IV.4.5.	Interaction avec d'autres éléments du cytosquelette.....	61
IV.4.6.	Transduction de signal.....	62
V.	<i>Interrelations Actine-Microtubules</i> .....	62
V.1.	Coordination mutuelle dans le transport intracellulaire.....	62
V.2.	Régulation de l'expansion cellulaire.....	63
V.3.	Coordination de la mitose et de la cytokinèse.....	64
PARTIE II : LES SEPTINES.....		67
I.	<i>Structure des Septines</i> .....	67
I.1.	La famille des Septines.....	67
I.2.	Structure générale des septines.....	68
I.2.1.	Polymorphisme.....	68
I.2.2.	Domaines fonctionnels.....	70
I.2.2.1.	Domaine central très conservé.....	70
I.2.2.2.	Domaines N- et C-terminaux variables.....	70
I.2.3.	Modifications post-traductionnelles.....	71
I.2.3.1.	Phosphorylation.....	71
I.2.3.2.	Ubiquitination et SUMOylation.....	72
I.3.	Dynamique de polymérisation des septines.....	72
I.3.1.	Assemblage en hétéro-oligomères.....	72
I.3.1.1.	Domaines G d'interaction des septines avec le GTP.....	72
I.3.1.2.	Dimères G et NC d'interaction des septines.....	73
I.3.1.3.	Assemblage et Composition variable des hétéro-oligomères.....	74
I.3.2.	Assemblage en structures d'ordre supérieur.....	78
I.3.2.1.	Chez la levure, assemblage de filaments en sablier ou en anneau.....	79
I.3.2.2.	Chez les mammifères, assemblage en filaments ou en anneaux.....	80
I.3.3.	Régulation de l'assemblage des Septines.....	81
I.3.3.1.	Régulation par le GTP/GDP.....	81
I.3.3.2.	Régulation par Cdc42 et Rho.....	81
I.3.3.3.	Régulation par phosphorylation et par sumoylation.....	82
I.3.3.4.	Régulation par l'anilline et la myosine II.....	82
II.	<i>Implication Fonctionnelle des Septines</i> .....	83
II.1.	Chez la levure.....	83
II.1.1.	Rôle dans la division cellulaire.....	83
II.1.2.	Rôle dans la compartimentation et les barrières de diffusion.....	83
II.2.	Chez les animaux.....	84
II.2.1.	Rôle dans l'organisation du cytosquelette et la division cellulaire.....	84
II.2.2.	Rôle dans l'organisation des membranes et dans le trafic vésiculaire.....	84
III.	<i>Interaction des Septines avec le Cytosquelette dans les cellules animales</i> .....	85
III.1.	Les Septines, un nouvel élément de cytosquelette ?.....	85
III.2.	Interaction avec l'actine.....	86

III.3.	Interaction avec les Microtubules .....	86
III.3.1.	Mise en évidence d'une interaction Septines-Microtubules .....	86
III.3.2.	Analyse structurale de l'interaction septines-Microtubules .....	88
III.3.3.	Régulation de l'organisation et des fonctions des microtubules par les septines .....	88
III.3.3.1.	Régulation de l'organisation des microtubules .....	89
III.3.3.2.	Régulation de la dynamique des microtubules .....	89
III.3.3.3.	Régulation du transport intracellulaire dépendant des moteurs moléculaires.....	90
III.3.3.4.	Régulation de la motilité des microtubules.....	91
IV.	<i>Septines et Physiopathologie</i> .....	93
IV.1.	Septines et maladies infectieuses .....	94
IV.2.	Septines et troubles neurologiques.....	94
IV.3.	Septines et cancer .....	95
IV.3.1.	Première implication des septines comme partenaires de fusion de MLL .....	95
IV.3.2.	Implication de SEPT9 .....	95
IV.3.2.1.	Locus de <i>SEPT9</i> .....	95
IV.3.2.2.	Nomenclature complexe de SEPT9 .....	97
IV.3.2.3.	SEPT9 comme partenaire de translocation de MLL dans la leucémie .....	98
IV.3.2.4.	SEPT9 dans les tumeurs solides.....	98
IV.3.3.	Implication des autres septines .....	100
PARTIE III :	LA CHIMIORESISTANCE .....	101
I.	<i>Le Cancer du Sein</i> .....	101
I.1.	Généralités .....	101
I.2.	Chimiothérapie anticancéreuse .....	102
II.	<i>Les Anticancéreux ciblant les Microtubules</i> .....	104
II.1.	Les agents déstabilisateurs et stabilisateurs de microtubules .....	104
II.2.	Les différents sites de liaison à la tubuline des agents ciblant les microtubules.....	106
II.2.1.	Le site de liaison aux Vinca-alcaloïdes .....	106
II.2.2.	Le site de liaison à la Colchicine.....	107
II.2.3.	Le site de liaison au Laulimalide et au Peloruside .....	108
II.2.4.	Le site de liaison aux Epothilones et aux Taxanes .....	108
II.2.4.1.	Epothilones.....	108
II.2.4.2.	Discodermolide et Cyclostreptine .....	109
II.2.4.3.	Taxanes.....	109
II.3.	Mécanisme d'action du Taxol.....	111
III.	<i>La Chimiorésistance au Taxol</i> .....	113
III.1.	Efflux par la P-Glycoprotéine.....	113
III.2.	Altération de la dynamique microtubulaire .....	115
III.3.	Modification de l'expression de gènes de $\beta$ -tubuline .....	116
III.3.1.	Mutations de gènes de tubuline .....	116
III.3.2.	Composition en isotypes de $\beta$ -tubuline .....	117
III.3.3.	Modifications post-traductionnelles de tubuline .....	118
III.4.	Modification de l'expression de protéines régulatrices de la dynamique microtubulaire .....	119
III.4.1.	Stabilisation par les MAPs.....	119
III.4.1.1.	Stabilisation par la protéine tau .....	119
III.4.1.2.	Stabilisation par MAP4 .....	120
III.4.2.	Déstabilisation par la stathmine .....	120
III.5.	Altération du cycle cellulaire et des voies de signalisation .....	121
III.5.1.	La voie MEK/ERK.....	121
III.5.2.	La voie HER2 .....	121
	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>123</b>
	PARTIE I : BIOLOGIE CELLULAIRE .....	125
I.	<i>Culture Cellulaire</i> .....	125
I.1.	Lignée MDA-MB 231 .....	125
I.2.	Conditions de culture .....	125
I.3.	Repiquage.....	126
I.4.	Congélation et Décongélation .....	126
II.	<i>Etablissement d'une Lignée Résistante au Taxol</i> .....	127
III.	<i>Dépolymérisation des Microtubules ou de l'Actine</i> .....	127
III.1.	Dépolymérisation des microtubules par le nocodazole .....	127
III.2.	Dépolymérisation de l'actine par la cytochalasine B.....	128
III.3.	Repolymérisation du cytosquelette par Wash-Out .....	128

IV.	<i>Transfection</i> .....	128
IV.1.	Transfection de plasmides à la Lipofectamine™ LTX .....	128
IV.1.1.	Principe .....	128
IV.1.2.	Protocole opératoire .....	128
IV.2.	Transfection de siRNA au Phosphate de Calcium .....	129
IV.2.1.	Principe .....	129
IV.2.2.	Protocole opératoire .....	130
V.	<i>Immunofluorescence</i> .....	130
V.1.	Principe .....	130
V.2.	Fixation .....	131
V.2.1.	Fixation au méthanol .....	131
V.2.2.	Fixation au paraformaldéhyde/saponine .....	131
V.3.	Immunomarquage .....	132
V.3.1.	Simple marquage .....	132
V.3.2.	Marquage multiple avec des anticorps d'espèces différentes .....	132
V.3.3.	Marquage multiple avec des anticorps de même espèce .....	133
V.4.	Montage et observation au microscope à fluorescence .....	134
VI.	<i>Cytométrie en flux</i> .....	134
VI.1.	Principe .....	134
VI.2.	Protocole opératoire .....	135
VII.	<i>Mesure des Vitesses de Croissance des Microtubules In Vivo</i> .....	136
VII.1.	Microscopie <i>in vivo</i> .....	136
VII.2.	Kymographes .....	136
PARTIE II : BIOCHIMIE .....		137
I.	<i>Extractions</i> .....	137
I.1.	Principe .....	137
I.2.	Réactifs .....	138
I.3.	Extraction du cytosol .....	138
I.4.	Extraction des microtubules totaux .....	139
I.5.	Lysats cellulaires totaux .....	139
II.	<i>Dosage des Protéines</i> .....	140
II.1.	Principe .....	140
II.2.	Protocole opératoire .....	140
III.	<i>Tests de Viabilité Cellulaire et de Cytotoxicité</i> .....	141
III.1.	Gamme de Taxol .....	141
III.2.	Dosage à la SulfoRhodamine B .....	141
III.2.1.	Principe .....	141
III.2.2.	Protocole opératoire .....	141
III.3.	Test MTT .....	142
III.3.1.	Principe .....	142
III.3.2.	Protocole opératoire .....	142
IV.	<i>Western Blot</i> .....	142
IV.1.	Principe .....	142
IV.2.	Préparation des échantillons .....	143
IV.3.	SDS-PAGE .....	143
IV.3.1.	Réactifs .....	143
IV.3.2.	Protocole opératoire .....	144
IV.4.	Electrotransfert .....	144
IV.4.1.	Réactifs .....	144
IV.4.2.	Protocole opératoire .....	145
IV.5.	Immunomarquage .....	145
IV.5.1.	Réactifs .....	145
IV.5.2.	Protocole opératoire .....	148
PARTIE III : BIOLOGIE MOLECULAIRE .....		149
I.	<i>Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel</i> .....	149
I.1.	Extraction d'ARN totaux .....	149
I.2.	Contrôle qualité des ARN totaux .....	149
I.3.	Synthèse du 1 <sup>er</sup> brin d'ADN complémentaire : Reverse Transcription .....	150
I.3.1.	Principe .....	150
I.3.2.	Protocole opératoire .....	150
I.4.	Amplification par PCR quantitative en temps réel .....	150
I.4.1.	Principe .....	150

I.4.2.	Choix des amorces .....	151
I.4.3.	Protocole opératoire .....	151
I.4.4.	Analyse des résultats .....	152
<b>PARTIE IV : PROTEOMIQUE.....</b>		<b>153</b>
<b>I. Préparation des échantillons .....</b>		<b>153</b>
I.1.	Réactifs .....	153
I.2.	Protocole opératoire .....	153
<b>II. Electrophorèse bidimensionnelle .....</b>		<b>153</b>
II.1.	Principe .....	153
II.2.	Première Dimension : IEF .....	154
II.2.1.	Réactifs .....	154
II.2.2.	Protocole opératoire .....	154
II.3.	Etape d'équilibration : Réduction et Alkylation.....	155
II.3.1.	Réactifs .....	155
II.3.2.	Protocole opératoire .....	155
II.4.	Deuxième Dimension : SDS-PAGE .....	156
II.4.1.	Réactifs .....	156
II.4.2.	Protocole opératoire .....	156
II.5.	Coloration des gels .....	157
II.5.1.	Coloration au Bleu de Coomassie .....	157
II.5.2.	Coloration au SyproRuby .....	157
<b>III. Spectrométrie de masse .....</b>		<b>157</b>
III.1.	Principe.....	157
III.2.	Digestion enzymatique des spots issus des gels 2D .....	158
III.2.1.	Réactifs .....	158
III.2.2.	Protocole opératoire .....	158
III.3.	MALDI-TOF .....	159
III.3.1.	Principe .....	159
III.3.2.	Protocole opératoire .....	160
III.4.	LC-MS/MS.....	161
III.4.1.	Principe .....	161
III.4.2.	Protocole opératoire .....	161
<b>IV. Analyse d'image .....</b>		<b>162</b>
IV.1.	Principe.....	162
IV.2.	Analyse d'image avec ImageMaster 2D Platinum .....	163
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>165</b>
<b>PARTIE I : ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE MDA-MB-231 RESISTANTE AU TAXOL.....</b>		<b>169</b>
<b>I. Modèle de Résistance Chronique au Taxol .....</b>		<b>169</b>
I.1.	Choix de la stratégie d'une résistance chronique au Taxol .....	169
I.2.	Cytotoxicité du Taxol .....	169
<b>II. Surexpression et incorporation de nouveaux isotypes de tubuline dans les microtubules .....</b>		<b>170</b>
<b>III. Etude de quelques Paramètres de l'Apoptose .....</b>		<b>172</b>
III.1.	Analyse du cycle cellulaire des cellules sensibles et résistantes par cytométrie en flux .....	172
III.2.	Modification d'expression de protéines impliquées dans la signalisation de l'apoptose.....	173
<b>IV. Discussion .....</b>		<b>173</b>
<b>PARTIE II : ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DES EXTRAITS MICROTUBULAIRES TOTAUX DES CELLULES TV ET T8 .....</b>		<b>177</b>
<b>I. Cartographie Protéomique .....</b>		<b>177</b>
<b>II. ....Etude Comparative du Protéome Péri-Microtubulaire des Cellules Sensibles et Résistantes au Taxol .....</b>		<b>181</b>
<b>III. Analyse du niveau d'expression génique des septines.....</b>		<b>190</b>
<b>IV. Discussion .....</b>		<b>192</b>
<b>PARTIE III : IMPLICATION DES SEPTINES DANS LA CHIMIORESISTANCE AU TAXOL.....</b>		<b>197</b>
<b>V. Localisation Subcellulaire des Septines.....</b>		<b>197</b>
V.1.	Localisation différentielle des septines dans les cellules sensibles et résistantes.....	197
V.2.	Localisation des septines en absence de filaments d'actine .....	199
V.1.	Localisation des septines en absence de microtubules.....	201
V.2.	Localisation des septines après traitement au Taxol.....	201
<b>VI. ....Restauration de la Sensibilité au Taxol des Cellules Résistantes par Inhibition Partielle des Septines .....</b>		<b>203</b>



VI.1. Impact de l'inhibition partielle d'une septine sur le niveau d'expression et de recrutement des autres septines .....	203
VI.2. .... Impact de l'inhibition partielle des septines sur la sensibilité au Taxol des cellules sensibles et résistantes .....	205
VII. Discussion .....	207
<b>PARTIE IV : SEPTINES ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TUBULINE : DEUX NOUVEAUX ACTEURS DE LA CHIMIORESISTANCE ? .....</b>	
I. Recrutement de SEPT2 sur les Microtubules Polyglutamylés .....	211
II. Niveau d'Accumulation des Modifications Post-Traductionnelles de Tubuline sur les Microtubules des Cellules Résistantes .....	213
III. Expression relative des Gènes codant certaines Enzymes Responsables du Niveau de Polyglutamylation de la Tubuline dans les Cellules Sensibles et Résistantes .....	215
IV. Implication de la Polyglutamylation et de la Tyrosination de la Tubuline dans la Restauration de la Sensibilité au Taxol des Cellules Résistantes T8.....	217
IV.1. Restauration de la sensibilité au Taxol des cellules résistantes T8 par inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase .....	217
IV.2. Restauration de la sensibilité au Taxol des cellules T8 par la surexpression d'enzymes impliquées dans la déglutamylation de la tubuline.....	221
V. Inter-Relations Septines-Polyglutamylation de Tubuline dans la Restauration de la Sensibilité au Taxol des Cellules Résistantes.....	225
V.1. Influence de l'inhibition partielle des septines sur la polyglutamylation mais pas sur la tyrosination de la tubuline .....	225
V.2. Influence de l'inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase sur le recrutement des septines sur les microtubules.....	227
V.3. Influence de la surexpression des déglutamylases sur le recrutement des septines .....	229
V.4. Influence de la longueur de la chaîne polyglutamylée .....	231
VI. Tentative d'Instauration d'une Résistance au Taxol des Cellules Sensibles par Surexpression des Polyglutamylases et de la Tyrosine Ligase.....	233
VI.1. Influence de la surexpression de polyglutamylases et de la tyrosine ligase sur le niveau d'expression des modifications post-traductionnelles de tubuline.....	233
VI.2. Influence d'une surexpression de polyglutamylases et de la tyrosine ligase sur la sensibilité au Taxol des cellules sensibles et résistantes .....	235
VI.3. Influence d'une surexpression de polyglutamylases et de la tyrosine ligase sur le recrutement des septines sur les microtubules.....	237
VI.4. Influence d'une surexpression de polyglutamylases et de la tubuline tyrosine ligase sur la localisation subcellulaire des septines .....	239
VII. Discussion .....	240
<b>PARTIE V : INFLUENCE DES SEPTINES ET/OU DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA TUBULINE SUR LA DYNAMIQUE MICROTUBULAIRE.....</b>	
I. Influence du Taxol sur la Vitesse de Croissance Microtubulaire .....	245
II. Modulation du Recrutement sur les Microtubules de MAP4.....	246
II.1. Diminution du recrutement de la protéine stabilisatrice MAP4 .....	246
II.2. Déstabilisation des microtubules par interaction entre MAP4 et les septines.....	246
III. ....Analyse du Recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 et de la Kinésine Dépolymérisante MCAK .....	247
III.1. Augmentation du recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 .....	247
III.2. Augmentation du recrutement de la kinésine dépolymérisante MCAK .....	248
IV. Discussion .....	248
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>251</b>
BIBLIOGRAPHIE.....	263
LISTE DES ANNEXES .....	295
ANNEXE 1 : ARTICLE PARU DANS PROTEOMICS .....	
ANNEXE 2 : PROTEINES IDENTIFIEES DANS LE PROTEOME PERI-MICROTUBULAIRE DES CELLULES TV ET T8 .....	

## AVANT-PROPOS

Bien que de nombreux progrès aient été réalisés aussi bien au niveau de la prévention que du traitement, le cancer du sein reste la première cause de mortalité chez les femmes par cancer gynécologique. Parmi les anticancéreux utilisés, on trouve notamment la molécule stabilisatrice Taxol® (paclitaxel, classe des Taxanes) qui, en se liant à la  $\beta$ -tubuline, entraîne une altération de la dynamique microtubulaire, bloque la mitose et conduit la cellule à l'apoptose. Cependant, l'émergence de clones chimiorésistants reste une limitation importante à l'utilisation de cette molécule.

L'acquisition de la résistance est un phénomène multifactoriel où plusieurs mécanismes peuvent concourir : surexpression de la P-glycoprotéine transmembranaire amplifiant l'efflux du Taxol des cellules, mutations dans les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de tubuline altérant soit la stabilité des microtubules soit la liaison de la drogue, ou modulations d'expression de certaines protéines régulatrices. Ces altérations contribuent ainsi à la restauration d'une certaine dynamique microtubulaire et à l'apparition du phénotype chimiorésistant.

Longtemps inexplorée, la signification physiologique des modifications post-traductionnelles de tubuline, qui sont le plus souvent réversibles, commence à être étudiée et met à jour leur implication dans différents mécanismes cellulaires, comme la prolifération cellulaire, la différenciation, l'autophagie, l'apoptose ou encore la réponse à des stress environnementaux. La plus étudiée est très certainement la phosphorylation, mais d'autres modifications protéiques telles que l'ubiquitination, l'acétylation ou la polyglutamylation, révèlent leur impact sur la régulation et le recrutement de protéines au niveau des microtubules, permettant d'influencer la dynamique microtubulaire.

L'objectif de mon projet de thèse a donc été d'explorer les variations protéiques de l'environnement des microtubules associées à la résistance au Taxol de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231, ainsi que les mécanismes cellulaires à l'origine de cette chimiorésistance.

La première partie du projet a reposé sur l'étude comparative du protéome péri-microtubulaire de cellules sensibles Tv et de cellules rendues résistantes par paliers à 25nM de Taxol (T8). Cette étude a permis de mettre en évidence la surexpression et l'enrichissement dans la fraction microtubulaire d'un certain nombre de protéines, et notamment de plusieurs septines, des GTPases filamenteuses associées avec le cytosquelette d'actine et de microtubules.

La deuxième partie du projet a alors consisté en une étude plus fonctionnelle des mécanismes impliquant les septines dans la chimiorésistance, afin de déterminer si le recrutement accru de ces protéines sur les microtubules est la cause ou correspond seulement à une conséquence du phénotype chimiorésistant. La mise en évidence d'une augmentation parallèle de la polyglutamylation et de la tyrosination des microtubules, ainsi que le recrutement sur la tubuline polymérisée de protéines impliquées dans la régulation de la dynamique microtubulaire, ont permis de proposer un mécanisme hypothétique de résistance au Taxol des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231.

# INTRODUCTION GENERALE



# PARTIE I : LES MICROTUBULES

## I. LE CYTOSQUELETTE CELLULAIRE

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments et de tubules protéiques qui s'étend dans tout le cytoplasme. Contrairement au squelette osseux qui est rigide, le cytosquelette cellulaire est une structure hautement dynamique qui se réorganise continuellement au cours des différents événements cellulaires (migration, division...). Tous les éléments du cytosquelette sont des structures protéiques allongées, organisées en réseaux, faisceaux ou câbles suivant les rôles qu'ils remplissent, qui résultent de la polymérisation d'éléments monomériques.

Trois types principaux de structures protéiques constituent le cytosquelette : les filaments intermédiaires, les filaments d'actine et les microtubules.

### I.1. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des polymères protéiques résistants et durables de 10nm de diamètre, présents dans le cytoplasme de la plupart des cellules. Ils sont appelés intermédiaires car leur diamètre apparent est compris entre celui des filaments d'actine et celui des microtubules (Figure 1 au centre).

Il existe 5 sous-types de filaments intermédiaires, qui diffèrent selon les différents types de protéines fibrillaires constituant les polymères, la nature de ces protéines étant variable d'un type de cellule à l'autre :

- les cytokératines de type acide ou basique dans les cellules épithéliales, caractérisées par de nombreux ponts disulfures
- la vimentine dans les fibroblastes
- les neurofilaments dans les neurones
- la lamine présente dans le noyau appliquée contre la membrane interne du noyau
- la desmine dans les cellules musculaires des muscles lisses, striés et dans le muscle cardiaque.

Au cours de leur assemblage, deux dimères superenroulés de ces protéines fibreuses s'associent de manière antiparallèle pour former une sous-unité tétramérique, un protofilament de 3nm de diamètre. Les tétramères s'ajoutent à un filament intermédiaire en cours d'élongation, et 8 protofilaments forment le filament intermédiaire de 10nm de diamètre.

Les filaments intermédiaires fournissent la force mécanique et la résistance au cisaillement. Ils sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que le maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire

de l'épithélium, le soutien de l'enveloppe nucléaire, et la formation des ongles, des cheveux et de la couche cornée de la peau (Eriksson *et al.* 2009).

## **I.2. Les filaments d'actine**

Dans de nombreuses cellules animales, l'actine est la protéine la plus abondante, avec 5% au moins de la masse protéique totale. Les filaments d'actine forment des structures dynamiques plus ou moins stabilisées par des protéines associées (Figure 1 à gauche). Par exemple, les formes stabilisées se rencontrent dans les microvillosités et les cellules musculaires.

L'actine G (globulaire) sous forme monomérique se polymérise en une double hélice serrée formant un filament flexible et polaire appelé actine F (fibrillaire). *In vivo*, la polymérisation de l'actine est contrôlée par de nombreuses protéines.

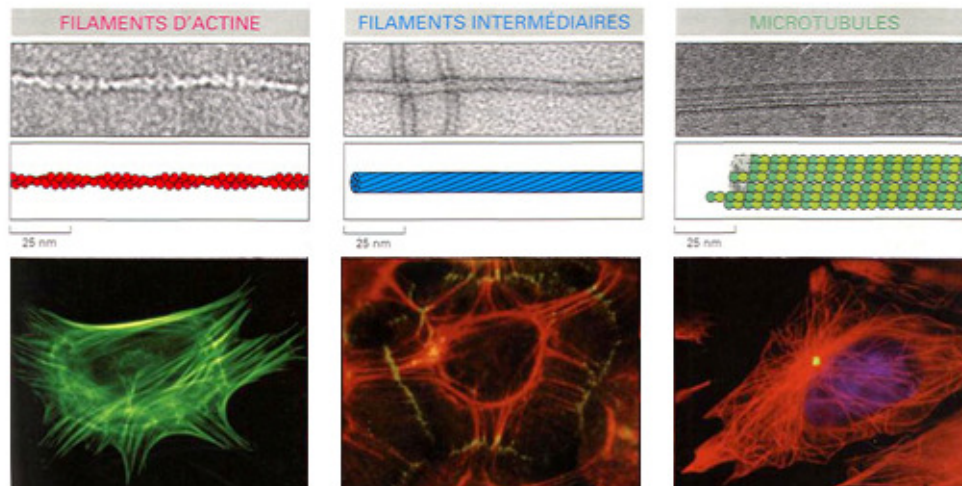
Les filaments d'actine déterminent la forme de la surface cellulaire et sont nécessaires pour la locomotion de la cellule en tant que tout. Ils sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires, comme la migration cellulaire, la traction sur la matrice extracellulaire, le maintien de l'intégrité tissulaire et la cytodierèse (Janmey *et al.* 2001).

Les filaments d'actine s'organisent en superstructures de façons très diverses suivant leurs fonctions biologiques : en réseaux ou faisceaux. L'actine réticulée, qui donne une consistance viscoélastique au cytoplasme et qui est localisée dans les lamellipodes et le réseau sous-membranaire, est appelée actine corticale. L'actine fasciculée forme des faisceaux serrés parallèles traversant la cellule, appelés fibres de stress.

## **I.3. Les microtubules**

Les microtubules sont très présents dans les cellules eucaryotes et particulièrement abondants dans les cellules nerveuses dans lesquelles ils représentent 10 à 20% des protéines totales. Les microtubules sont des polymères cylindriques, creux et rigides, constitués de dimères de tubuline (Figure 1 à droite).

Comme les filaments d'actine, les microtubules sont polarisés et présentent, de plus, une « instabilité dynamique » qui peut conduire à un raccourcissement très brutal d'un microtubule, pouvant être à l'origine d'une force importante. Ils déterminent la position des organites entourés d'une membrane et dirigent le transport intracellulaire, ce qui leur vaut un rôle grandissant dans différentes voies de signalisation cellulaire.



**Figure 1 : Le cytosquelette cellulaire**

Cytosquelette observé en imagerie électronique (en haut), sous forme schématique (au milieu), et en immunofluorescence (en bas)

## II. MICROTUBULES ET VIE CELLULAIRE

En plus d'être importants pour maintenir la structure de la cellule tant au niveau de sa forme que de son architecture interne, les microtubules sont aussi impliqués au cours de deux étapes primordiales de la vie cellulaire : lors de la division cellulaire, où ils forment le fuseau mitotique, et lors de l'apoptose, ou mort programmée cellulaire, qui permet notamment à un organisme multicellulaire de réguler la prolifération cellulaire.

### II.1. Cellule en mitose

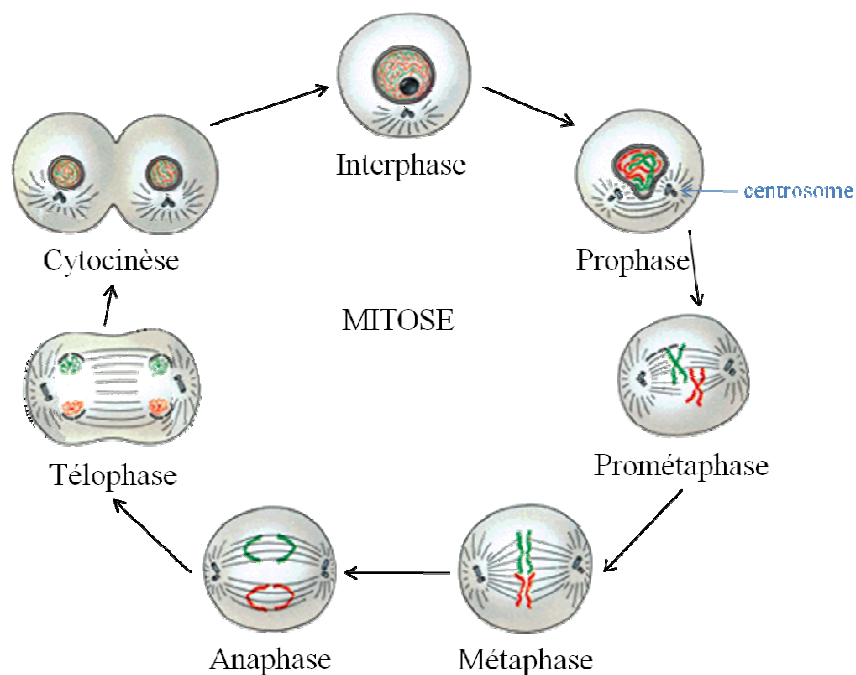
Durant la majorité du cycle cellulaire, les microtubules sont organisés en réseau. Lorsque les cellules entrent en mitose (division cellulaire), les microtubules forment le fuseau mitotique sans lequel la division et la répartition correcte du matériel génétique entre les deux cellules filles sont impossibles. Les microtubules servent alors de rails le long desquels les chromosomes sont dirigés pour se répartir entre les deux cellules filles. Le processus de dépolymérisation du réseau interphasique pour former le fuseau mitotique, ainsi que l'accrochage et la séparation des chromosomes, nécessite une dynamique hautement contrôlée et très complexe.

Dans les cellules dont le réseau est organisé par un centrosome, celui-ci est également dupliqué lors de la répllication de l'ADN. Lors de la prophase, les deux centrosomes se déplacent autour du noyau tout en nucléant deux asters de microtubules. Au cours de ce processus, l'enveloppe nucléaire se désagrège, les microtubules astraux raccourcissent et, en même temps, les centrosomes nucléent un



grand nombre de microtubules qui se mettent à croître de façon asymétrique vers les chromosomes (Zhai *et al.* 1996). L'alignement des chromosomes lors de la métaphase et la ségrégation durant la division cellulaire dépendent principalement des interactions entre le kinétochore et le fuseau mitotique. Le kinétochore est un complexe protéique situé dans la région du centromère des chromosomes. Pour une ségrégation fidèle des chromosomes, les kinétochores doivent capturer le fuseau de microtubules et connecter toutes les chromatides filles aux pôles opposés du fuseau avant l'anaphase. La mitose est complète à la fin de la télophase, lorsque les deux jeux de chromosomes atteignent les pôles du fuseau et se décondensent. Une nouvelle enveloppe nucléaire se forme autour de chaque lot de chromosomes ce qui permet la formation des noyaux des futures cellules filles. Des faisceaux de microtubules se forment dans l'espace entre les nouveaux noyaux et sont nécessaires au bon positionnement du plan de clivage entre les deux asters, au recrutement de protéines spécifiques au niveau du site de division (protéines motrices comme la kinésine MKLP-1, protéines associées aux chromosomes, kinases Polo et Aim-1, GTPases Rho, Rac, cdc42, et septines) (Straight and Field 2000) et à la communication avec le cortex cellulaire pour stimuler la formation du sillon de clivage. La division du cytoplasme (cytocinèse) se fait grâce à la formation d'un anneau d'actomyosine qui se contracte pour diviser la cellule à mi-chemin entre les deux pôles du fuseau (Figure 2).

Les microtubules étant des acteurs primordiaux de la division cellulaire, ils sont aussi une des cibles privilégiées des agents thérapeutiques anticancéreux tels que les Taxanes et les Vinca-alcaloïdes (voir Partie III : La Chimiorésistance, II Les Anticancéreux ciblant les Microtubules). Ces agents, en abolissant les propriétés dynamiques des microtubules, empêchent la division cellulaire.



**Figure 2 : Les différentes phases de la division cellulaire**

## II.2. Cellule en apoptose

### II.2.1. Apoptose

Le maintien de l'intégrité d'un organisme et de ses tissus dépend d'un équilibre subtil entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire programmée de type I ou apoptose. Une croissance incontrôlée, une anomalie de différenciation et/ou un dysfonctionnement de l'apoptose aboutissent à des modifications significatives de cet équilibre.

Les modifications cellulaires les plus caractéristiques de l'entrée en apoptose sont une perte d'adhérence cellulaire, des modifications des structures à la surface cellulaire telle que l'apparition de structures en forme de bulles, phénomène appelé « blebbing », et la fragmentation en corps apoptotiques qui dépendent de réarrangements des cytosquelettes d'actine et de microtubules. La phosphorylation de protéines structurales et/ou enzymatiques ainsi que le clivage protéolytique de certains composants de ces réseaux participent au recrutement et à la réorganisation des structures cellulaires pour mettre en place la machinerie qui conduira la cellule à se fragmenter en corps apoptotiques (Mollinedo and Gajate 2003).

### II.2.2. Microtubules et apoptose

L'une des implications des microtubules dans l'apoptose pourrait être de servir de structure de séquestration pour les protéines régulatrices de l'apoptose telles que Bim et survivine. Bien que plusieurs séries de données mettent en évidence des liens importants entre l'intégrité du cytosquelette de microtubules et la régulation de l'apoptose, les mécanismes moléculaires de ces liens sont probablement très nombreux et loin d'être encore tous compris (Mollinedo and Gajate 2003).

#### II.2.2.1. Protéines de la famille de Bcl-2

Le programme apoptotique intracellulaire est modulé par des signaux qui agissent principalement en régulant les niveaux d'activité des membres des familles Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) et IAP (Inhibitor of Apoptosis). La famille Bcl-2 contient une sous-famille de protéines pro-apoptotiques dont Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) et Bmf (Bcl-2 modifying factor) qui sont des liens importants entre le cytosquelette et la machinerie apoptotique. En effet, ces protéines s'associent aux microtubules (Bim) ou à l'actine (Bmf) (Puthalakath *et al.* 1999; Puthalakath *et al.* 2001). Bim est l'une des protéines majeures reliant les microtubules et le déclenchement de l'apoptose.

Dans les cellules saines, Bim est liée à la chaîne légère du moteur moléculaire dynéine. Ainsi séquestrée dans des complexes avec ce moteur associé aux microtubules, cette molécule est alors incapable d'induire l'apoptose (Puthalakath *et al.* 1999). Certains stimuli aboutissent au relargage de

Bim des microtubules et on observe alors une translocation de la protéine vers les mitochondries. Cette relocalisation lui permet d'interagir avec Bcl-2 et Bcl-xL, neutralisant ainsi leurs activités anti-apoptotiques. De plus Bim peut alors interagir avec Bax, une autre protéine de l'apoptose. Cette interaction induit un changement conformationnel de Bax qui est un des événements précoces de la signalisation de l'apoptose (Marani *et al.* 2002).

### II.2.2.2. La survivine

La survivine est le plus petit des membres de la famille des IAP. Elle est impliquée à la fois dans la préservation de la viabilité cellulaire et dans la régulation de la mitose dans les cellules cancéreuses (Reed and Bischoff 2000). La localisation subcellulaire de la survivine a longtemps été controversée. La survivine est présente dans deux compartiments subcellulaires très différents. Environ 80% de la survivine est cytosolique et s'associe avec les microtubules interphasiques, les centrosomes et les microtubules du fuseau en métaphase et anaphase. Une autre petite partie est nucléaire et se retrouve sur les kinétochores des chromosomes lors de la métaphase et au niveau de la zone centrale du fuseau en anaphase (Fortugno *et al.* 2002). La survivine associée aux microtubules pourrait réguler les fonctions microtubulaires et la mise en place d'un fuseau bipolaire normal (Uren *et al.* 2000) et être ainsi un des gardiens de la viabilité au cours de la division.

De plus il existe un pool mitochondrial de la survivine qui n'est pas régulé de la même façon au cours du cycle cellulaire. L'accumulation de la survivine dans ce compartiment cellulaire est parfaitement adaptée pour bloquer l'initiation de la mort cellulaire en réponse à des stimuli variés. Lorsque ces stimuli sont perçus, la survivine est relarguée et peut interagir avec des cofacteurs, empêchant ainsi la mise en place de l'apoptose (Dohi *et al.* 2004).

### II.2.2.3. Apoptose induite par des substances ayant un effet sur les microtubules

Les agents anti-microtubules, à la fois ceux forçant la polymérisation ou ceux l'inhibant, ont des activités inductrices de l'apoptose. Cette activation semble provenir, entre autres, d'une inactivation de Bcl-2 par phosphorylation. Plusieurs études ont démontré que la phosphorylation de Bcl-2 peut être spécifiquement induite par les agents anti-microtubulaires tels que le Taxol. Cet effet n'a pas été observé dans le cas des agents endommageant l'ADN (Haldar *et al.* 1997). Ceci a conduit à voir Bcl-2 comme le « gardien de l'intégrité microtubulaire ».

Cependant, le rôle de la phosphorylation de Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose est encore controversé car il a été montré que cette protéine est phosphorylée dans des conditions normales au cours de la phase G2/M du cycle cellulaire (Yamamoto *et al.* 1999). Pour réconcilier les deux faits, il faut envisager que l'apoptose soit induite non pas directement par la phosphorylation de Bcl-2 mais

par une phosphorylation prolongée de Bcl-2 qui normalement doit disparaître, mais qui est prolongée lors de l'utilisation des agents interférant avec les microtubules. Dans le cas du Taxol, la suite d'événements pourrait être : arrêt des cellules en phase M, induction du maintien prolongé de la phosphorylation de Bcl-2 inhibant sa liaison à la protéine Bax, ce qui mène à l'augmentation du niveau de Bax et l'apoptose se met en place (Haldar *et al.* 1997). L'interprétation des résultats après traitements avec ces substances est complexe car il a été montré que le Taxol et ses analogues peuvent induire l'expression de certains gènes indépendamment de la stabilisation microtubulaire ou de l'interruption de la mitose (Moos and Fitzpatrick 1998) (voir Partie III : La Chimiorésistance, II.3 Mécanisme d'action du Taxol).

## **II.3. Cellule en Interphase**

### **II.3.1. Maintien de l'architecture intracellulaire**

Les microtubules sont des éléments essentiels de l'architecture dynamique de la cellule. Les organites du système endomembranaire et les intermédiaires de transport qui les relient sont distribués dans le cytoplasme grâce au réseau de microtubules. Ainsi dans la plupart des cellules, le réticulum endoplasmique (RE) s'étend jusqu'à la périphérie de la cellule, et les mitochondries, quant à elles, se trouvent plutôt localisées à la périphérie, à proximité des extrémités (+) des microtubules. L'appareil de Golgi, les endosomes tardifs et les lysosomes se retrouvent plutôt vers l'extrémité (-) des microtubules, à proximité du centrosome et du noyau. Cette disposition spatiale des différents organites joue un rôle important dans la communication entre ces derniers et le fonctionnement des différentes voies de transport. En absence de microtubules, cette disposition est perdue et le trafic vers la surface cellulaire ainsi qu'entre les organites est beaucoup moins efficace (Cole and Lippincott-Schwartz 1995).

### **II.3.2. Trafic intracellulaire**

Les cellules présentent une organisation interne complexe et compartimentée : le noyau, l'appareil de Golgi, le RE, sont autant d'entités fonctionnelles distinctes. Chaque compartiment génère un ensemble de produits qui sont ensuite distribués à d'autres compartiments à l'intérieur de la cellule ou dirigés vers l'extérieur de la cellule. Le trafic intracellulaire désigne l'adressage de protéines via des transporteurs membranaires vers les différents compartiments jusqu'à leur destination finale.

Ce système de distribution est complexe et nécessite trois types de moteurs moléculaires : la myosine, les kinésines et la dynéine. Les transports se produisent le long de deux types de polymères du cytosquelette qui sont alors utilisés tels des « rails » : les filaments d'actine empruntés par la myosine pour les déplacements sur de faibles distances ou pour l'ancrage des transporteurs vésiculaires à

proximité des membranes cibles, et les microtubules empruntés par la kinésine et la dynéine pour assurer le transport sur de longues distances. Le transport s'initie lorsque le moteur moléculaire approprié se lie à un chargement (molécule ou vésicule) au niveau de sa « queue » et simultanément se lie au rail (actine ou microtubules) au niveau de ses « têtes » motrices. Les moteurs moléculaires se déplacent ensuite le long du rail en répétant des cycles coordonnés d'accrochage-déaccrochage de ses deux « têtes ». Ces mouvements nécessitent de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Mallik and Gross 2004).

### II.3.3. Transduction du signal

Alors que les facteurs impliqués dans la transduction des signaux commencent à être bien identifiés, on connaît encore peu de chose sur leur organisation spatiale au sein du cytoplasme ainsi que sur la façon dont ces signaux vont atteindre leurs cibles, généralement au niveau nucléaire. Depuis une dizaine d'années, l'implication des microtubules dans ce processus de transmission de l'information a été mise en évidence (Gundersen and Cook 1999). Cette notion résulte de 3 types d'observations :

- De nombreux facteurs impliqués dans la transduction du signal sont liés aux microtubules : soit directement à la tubuline, soit indirectement via des protéines associées aux microtubules. Ces effecteurs sont aussi bien des protéines-kinases ou des phosphatases, que des molécules adaptatrices, des facteurs de transcription ou encore la protéine chaperonne Hsp90 comme nous l'avons montré au laboratoire (Giustiniani *et al.* 2009b).

- La dépolymérisation ou la stabilisation des microtubules entraîne la modification d'un grand nombre de fonctions cellulaires régulées par la signalisation. En effet, l'utilisation d'agents pharmacologiques dépolymérisant ou stabilisant les microtubules par action le plus souvent directe sur la tubuline permet d'observer des effets spécifiques sur des processus cellulaires impliquant la transduction de signaux comme la prolifération cellulaire, l'expression de gènes, la signalisation par les récepteurs, l'apoptose ou encore la polarisation cellulaire.

- Les microtubules sont la cible de certaines voies de signalisation et peuvent ainsi participer à la transmission de l'information en aval. Les modifications observées sur les microtubules peuvent être une modification de la dynamique du réseau ou de l'organisation du réseau avec réorientation du centrosome. L'utilisation d'agents pharmacologiques altérant la dynamique des microtubules dans le traitement des cancers par chimiothérapie est d'ailleurs à l'origine d'un gros effort pour identifier les voies de transduction qui relayent les effets biologiques de ces substances.

### III. STRUCTURE ET COMPOSITION DES MICROTUBULES

#### III.1. Structure générale

Les microtubules sont les constituants les plus rigides du cytosquelette. Ils ont un diamètre d'environ 25nm et une longueur variable du fait de leur dynamique, allant jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres, ce qui dépasse largement l'échelle de la cellule (Wade and Hyman 1997).

Cette rigidité leur est conférée par une structure en tube provenant de l'assemblage particulier des monomères qui les composent. *In vivo*, les microtubules sont généralement constitués de 13 protofilaments qui sont eux-mêmes formés par l'assemblage de dimères de tubuline  $\alpha/\beta$  en présence de GTP, mais il existe des microtubules qui sont le résultat de l'assemblage de 11 ou 16 protofilaments (Kirschner 1978). L'unité élémentaire du microtubule est constituée par un hétérodimère de tubuline formé par l'association tête-queue d'une sous unité  $\alpha$  et d'une sous unité  $\beta$  (Desai and Mitchison 1997). Les protofilaments s'associent latéralement en feuillet à deux dimensions qui se referme ensuite sur lui-même pour former la paroi cylindrique du microtubule (Chretien *et al.* 1995) (Figure 3).

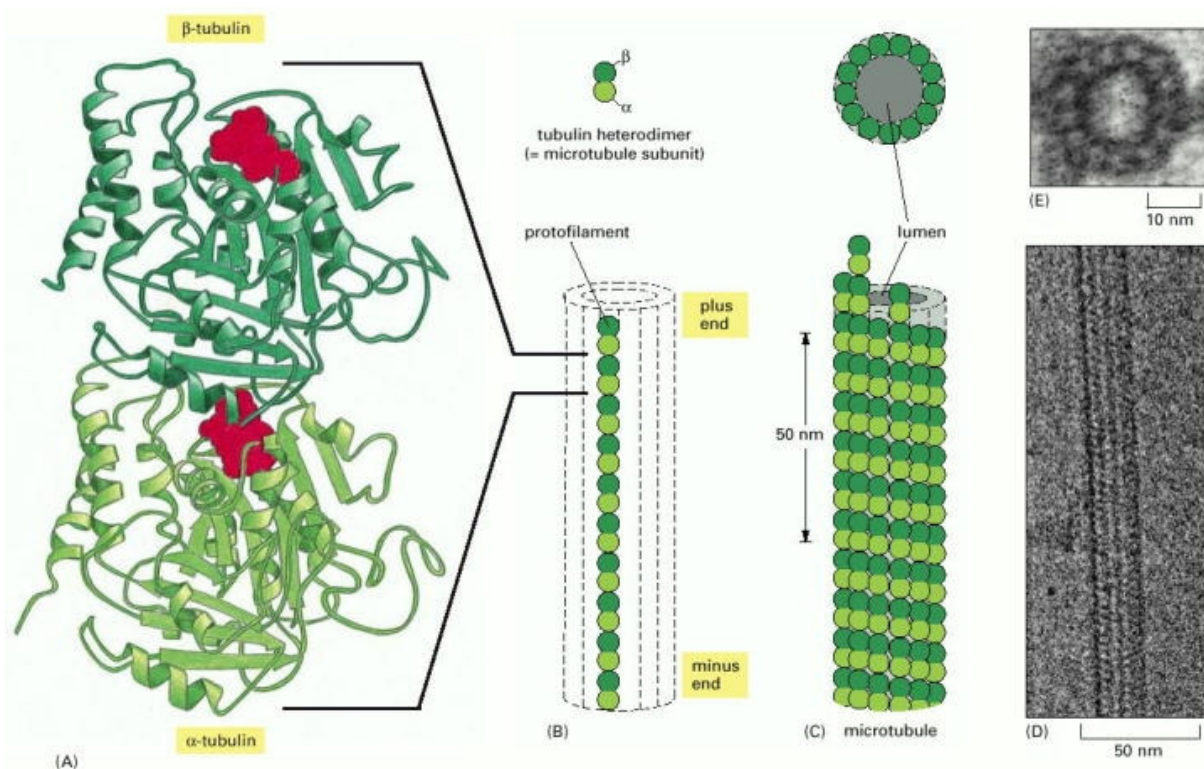
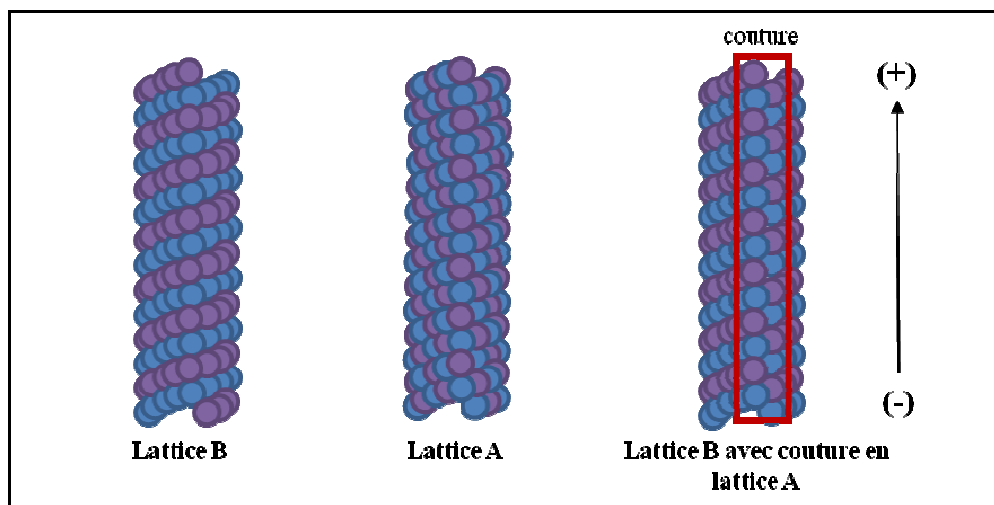


Figure 3 : Structure d'un microtubule et de ses sous-unités

A : hétérodimère d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline, B : représentation schématique d'un protofilament, C : représentation schématique d'un microtubule, D : segment de microtubule en microscopie électronique, E : coupe transversale de microtubule en microscopie électronique (Alberts 2002)



Les microtubules s'organisent principalement en « lattice B », un arrangement structural où les sous-unités voisines les plus proches entre deux protofilaments adjacents sont identiques ( $\alpha$ - $\alpha$  et  $\beta$ - $\beta$ ) (Song and Mandelkow 1993). Cependant, la majorité des microtubules présentent en plus une couture sous forme de « lattice A » où, en revanche, les sous-unités voisines les plus proches entre deux protofilaments adjacents sont différentes ( $\alpha$ - $\beta$  et  $\beta$ - $\alpha$ ) (Figure 4). Cette couture peut d'ailleurs jouer un rôle au niveau de la stabilité du microtubule et/ou de sa liaison à des MAPs (Microtubule Associated Proteins) spécifiques (Kikkawa *et al.* 1994).



**Figure 4 : Les différentes organisations (lattices) du microtubule**

Des changements conformationnels de la tubuline due à l'hydrolyse du GTP sont à l'origine de différences observées au niveau des extrémités du microtubule entre les phases d'élongation et de raccourcissement (Chretien *et al.* 1995). Les microtubules en croissance présentent habituellement des extensions longues de plusieurs microns et courbes de type feuillet. En revanche, en phase de raccourcissement, les protofilaments tendent à s'enrouler sur eux-mêmes en anneaux serrés (Mandelkow *et al.* 1991). En fonction du nombre de protofilaments présents dans le feuillet, la courbure du feuillet est plus ou moins importante.

Les microtubules sont des polymères polarisés dynamiques et orientés dans la cellule. Ils possèdent une extrémité (+) à croissance rapide dirigée vers la périphérie de la cellule et une extrémité (-) à croissance lente qui, *in vivo*, est associée au centrosome (Raff *et al.* 1997). Les microtubules présentent également une polarité structurale : les sous-unités de  $\beta$ -tubuline couvrent plus spécifiquement l'extrémité (+) alors que les sous-unités d' $\alpha$ -tubuline sont exposées à l'extrémité (-) (Nogales 1999).

## III.2. Composition

Les microtubules sont composés de dimères de tubuline, protéine globulaire d'environ 55kDa. Les tubulines appartiennent à une famille multigénique qui compte aujourd'hui sept membres :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  et  $\eta$  (Dutcher 2001).

### III.2.1. Les tubulines $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\zeta$ et $\eta$

Chez les eucaryotes, la  $\gamma$ -tubuline est une protéine ubiquitaire, hautement conservée au cours de l'évolution, qui présente près de 30% d'homologie avec les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Elle se trouve particulièrement concentrée au niveau du centrosome et d'autres centres organisateurs de microtubules (MTOC), associée dans un complexe  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -Tubulin Ring Complex). La  $\gamma$ -tubuline participe ainsi au recrutement des dimères de tubuline  $\alpha/\beta$  qui se forment à l'extrémité (-) des microtubules et joue ainsi le rôle d'amorce dans la nucléation des microtubules (Inclan and Nogales 2001).

Contrairement à la  $\gamma$ -tubuline, la  $\delta$ -tubuline n'est pas présente chez tous les eucaryotes. Elle semble jouer un rôle dans l'assemblage des corps basaux chez la paramécie (Garreau de Loubresse *et al.* 2001). Sa localisation (centrosomale, cytoplasmique et/ou nucléaire) est encore sujette à controverse (Chang and Stearns 2000; Smrzka *et al.* 2000).

La  $\epsilon$ -tubuline a été localisée à proximité du centrosome chez *Chlamydomonas* (Inclan and Nogales 2001). Elle a également été identifiée chez l'homme et le trypanosome (Vaughan *et al.* 2000).

La  $\zeta$ -tubuline a été mise en évidence chez *Trypanosoma brucei* et *Leishmania major* (Vaughan *et al.* 2000) mais sa localisation cellulaire et son rôle sont à ce jour encore inconnus.

Enfin, le gène codant la  $\eta$ -tubuline a pu être cloné chez la paramécie (Ruiz *et al.* 2000).

### III.2.2. Les tubulines $\alpha$ et $\beta$

Chez les eucaryotes, ces tubulines sont ubiquitaires. Les monomères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  sont structuralement semblables avec une masse moléculaire apparente d'environ 55kDa. Ce sont des protéines globulaires acides qui s'organisent spontanément sous la forme d'un hétérodimère  $\alpha/\beta$ , lequel possède des propriétés d'auto-assemblage permettant la formation des microtubules. Ces monomères comptent environ 450 acides aminés chacun et présentent près de 40% d'homologie entre eux (Burns 1991). L'analyse de leur séquence a montré que certaines régions sont fortement conservées entre les espèces (Luduena *et al.* 1992).



### III.3. Domaines fonctionnels

D'une manière générale, ces protéines présentent trois domaines fonctionnels (Nogales *et al.* 1998) :

- Le domaine N-terminal qui inclut le site de liaison du GTP. Chaque monomère est capable de s'associer à une molécule de GTP, non échangeable pour la tubuline  $\alpha$  (site N) et échangeable pour la tubuline  $\beta$  (site E).

- Le domaine intermédiaire comprenant en particulier le site de fixation du Taxol, un agent stabilisateur de microtubules.

- Le domaine C-terminal qui semble généralement impliqué dans la fixation des protéines associées aux microtubules (MAPs).

### III.4. Polymorphisme

#### III.4.1. Hétérogénéité de la tubuline

Une des caractéristiques majeures de la tubuline est liée à son haut degré d'hétérogénéité (Luduena 1998). On désigne par isotopes les produits des différents gènes caractérisés par leur séquence d'acide aminés et par isoformes l'ensemble des dérivés ayant subi un épissage alternatif ou des modifications post-traductionnelles. Le polymorphisme de la tubuline résulte à la fois de la diversité génétique de cette famille et des différentes combinaisons possibles entre ses isoformes. Il génère ainsi un très grand nombre de molécules de tubuline dont la signification fonctionnelle reste le plus souvent obscure.

#### III.4.2. Polymorphisme génétique de la tubuline

Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  existent sous la forme de plusieurs isotopes dont le nombre varie suivant la sous-unité et l'espèce étudiée. Chez les mammifères, il existe 7 gènes  $\alpha$  et 6 gènes  $\beta$  fonctionnels alors que chez la drosophile, seulement 4 isotopes de  $\beta$ -tubuline ont pu être mis en évidence. La majeure partie des différences existant entre ces isotopes est retrouvée au niveau d'une région couvrant les 15 derniers résidus en C-terminal. Cette région serait impliquée, *in vitro*, dans la régulation de la polymérisation de la tubuline (Rai and Wolff 1998). Son implication dans l'interaction des microtubules avec les MAPs a également été démontrée (Nogales *et al.* 1998) et suggère l'importance du polymorphisme génétique de la tubuline sur la stabilité et les fonctions des microtubules dans la cellule. La dynamique des microtubules se trouve influencée par la composition en isotopes de tubuline. Ainsi, les microtubules polymérisés à partir de dimères de tubulines  $\alpha\beta$  sont

significativement plus dynamiques que ceux polymérisés à partir d'autres classes ( $\alpha\beta$ II ou  $\alpha\beta$ IV) (Panda *et al.* 1994).

L'expression différentielle des isotypes influence également le comportement de la cellule vis-à-vis des agents anti-mitotiques. Ainsi, les isotypes les plus dynamiques se révèlent être les plus résistants à la liaison des substances stabilisatrices comme le Taxol (Derry *et al.* 1997). De même, une corrélation a été établie entre une augmentation de la  $\beta$ III-tubuline et une résistance accrue au Taxol dans des cellules provenant de cancer de la prostate. L'analyse des séquences entre les différents isotypes de  $\beta$ -tubuline montre que cette résistance ne résulte pas d'un défaut de liaison entre la substance pharmacologique et les microtubules mais que celle-ci semble liée aux propriétés dynamiques de chaque isotype (Ranganathan *et al.* 1998).

#### III.4.3. Polymorphisme lié aux modifications post-traductionnelles de la tubuline

Les deux sous-unités de la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent subir diverses modifications post-traductionnelles qui ne sont pas exclusives et varient d'un type cellulaire à l'autre (Figure 5). A l'exception du cycle détyrosination/tyrosination et de la nitrotyrosination, toutes les autres modifications post-traductionnelles sont réunies chez un ancien eucaryote : *Giardia lamblia* (Weber *et al.* 1997). Ces modifications sont observées le plus souvent sur une population de microtubules qualifiés de stables en raison de leur demi-vie prolongée et servent ainsi de marqueurs de stabilité des microtubules. Le domaine C-terminal de la tubuline est à la fois le siège de la plupart des modifications post-traductionnelles et celui des interactions avec les MAPs (Rosenbaum 2000).

Ceci suggère que ces modifications régulent la liaison des MAPs aux microtubules et ainsi coordonnent les différentes fonctions des microtubules. Diverses études ont montré qu'une seule et même molécule de tubuline peut porter plusieurs modifications post-traductionnelles (Schneider *et al.* 1998; Pechart *et al.* 1999).

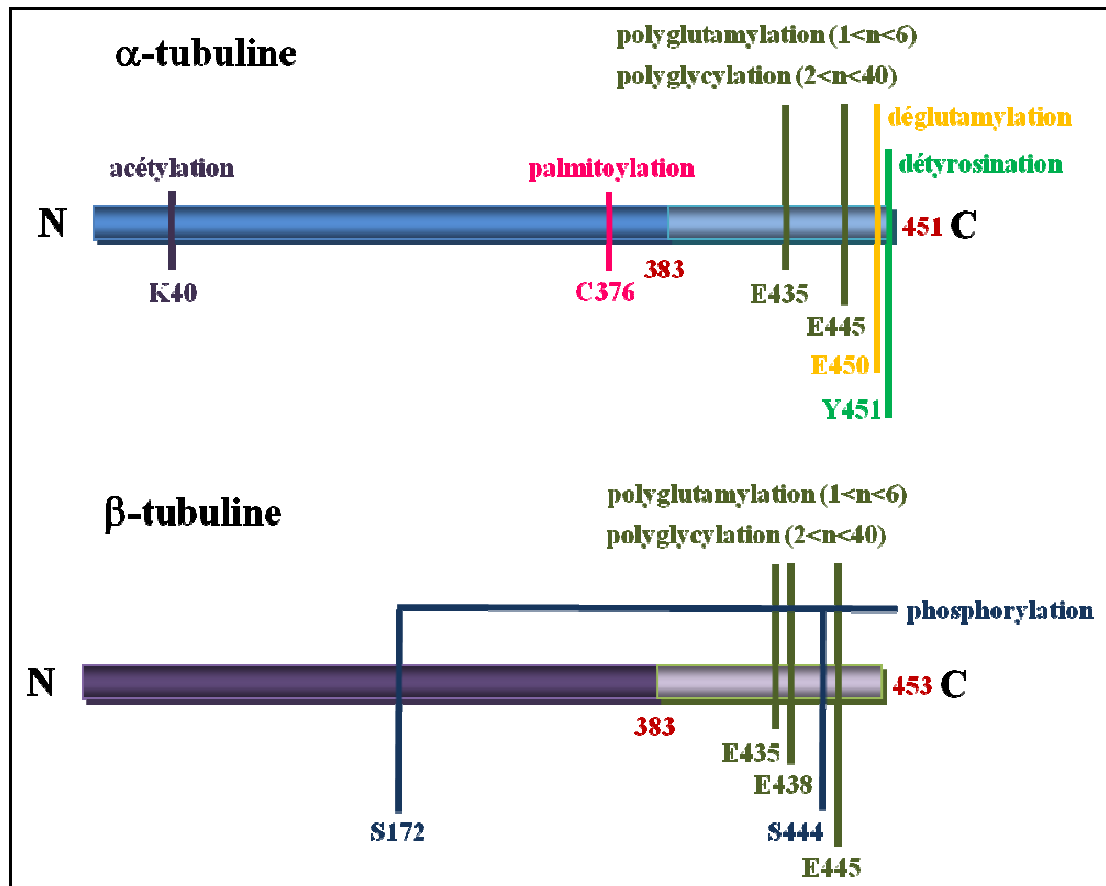


Figure 5 : Modifications post-traductionnelles de la tubuline

### III.4.3.1. Phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'estérification de la chaîne latérale d'un acide aminé comme la sérine ou la thréonine, par addition d'un groupement phosphate sur les résidus alcools. Cette phosphorylation peut également se produire sur les tyrosines. Chez les eucaryotes, la phosphorylation des protéines est l'un des mécanismes de régulation le plus important et le plus fréquent. De nombreuses enzymes et récepteurs sont activés après une phosphorylation. Cette modification est catalysée par diverses protéines kinases spécifiques alors que les phosphatases se chargent de déphosphoryler les protéines.

La tubuline peut être phosphorylée par la protéine kinase Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1), cette modification intervenant généralement au niveau de la sérine 172 de la  $\beta$ -tubuline. Cette phosphorylation par Cdk1 semble avoir lieu au cours de la mitose et entraînerait une diminution de l'incorporation de l'hétérodimère de tubuline dans le microtubule. Ainsi, la phosphorylation de la tubuline semble avoir un rôle dans la régulation de la dynamique des microtubules (Fourest-Lieuvin *et al.* 2006).

De nombreuses autres kinases sont capables de phosphoryler *in vitro* et/ou *in vivo* les deux sous-unités de la tubuline en différents sites. C'est le cas des tyrosines kinases, des caséines-kinases I et II, de la calcium/calmoduline-kinase, de la kinase AMPc dépendante et de la phosphatidyl-inositol-3-kinase (MacRae 1997). La phosphorylation de la tubuline semble donc jouer un rôle non seulement sur la dynamique des microtubules mais également intervenir dans certaines voies de signalisation cellulaire.

Dans la plupart des cas, les modifications post-traductionnelles de la tubuline s'effectuent au niveau de la tubuline déjà polymérisée en microtubule, contrairement à la phosphorylation, qui s'effectue sur la tubuline libre.

#### III.4.3.2. Palmitoylation

La palmitoylation est une modification post-traductionnelle que l'on retrouve dans des protéines associées à la membrane lipidique contrairement aux protéines cytosoliques. Chez les eucaryotes, cette modification consiste en la fixation covalente d'une chaîne d'acides gras, le palmitate (C16), sur les cystéines en position 376 de la tubuline libre ou associée au microtubule (Ozols and Caron 1997).

La palmitoylation pourrait être impliquée dans le maintien d'organites cellulaires ou le transport de vésicules. Cependant, les microtubules stabilisés par le Taxol ne présentent pas cette modification post-traductionnelle (Caron 1997).

#### III.4.3.3. Acétylation

L'acétylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un groupement acétyl (COCH<sub>3</sub>) sur les résidus lysine d'une protéine (pour revue : Perdiz *et al.* 2011). Dans le cas de la tubuline, l'acétylation se produit uniquement dans la lumière du microtubule au niveau de la lysine 40 de l' $\alpha$ -tubuline. C'est la seule modification post-traductionnelle qui ait lieu au niveau de l'extrémité N-terminale de la tubuline (Figure 5) (Hammond *et al.* 2008). Cette modification post-traductionnelle est réversible et l'accès à ce site d'acétylation reste encore incompris. La stabilité des microtubules est plutôt une cause d'acétylation qu'une conséquence de cette modification post-traductionnelle. L'acétylation de la tubuline a été observée dans des microtubules au comportement dynamique normal *in vitro* (Maruta *et al.* 1986). La régulation de cette modification post-traductionnelle est sous le contrôle de deux types d'enzymes : des acétyltransférases et des déacétylases. Alors que les enzymes impliquées dans la désacétylation de la tubuline sont connues depuis une dizaine d'années, ce n'est que récemment que celles responsables de l'acétylation de la tubuline ont été identifiées (pour revue : Perdiz *et al.* 2011). La sous-unité ELP3 du complexe Elongator est la première acétylase de tubuline à avoir été identifiée suite à l'observation surprenante que des neurones dépourvus d'ELP3 se développaient anormalement et surtout n'étaient constitués

que de tubuline non acétylée (Creppe *et al.* 2009). En fait, un répertoire grandissant de protéines capables d'acétyler la tubuline en interphase commence à faire jour : la sous-unité ARD1 du complexe acétyltransférase ARD1/NAT1 (Ohkawa *et al.* 2008), l'histone acétyltransférase Gcn5 dont l'action sur les microtubules a été découverte au cours de la différenciation des myoblastes (Conacci-Sorrell *et al.* 2010) ou encore la protéine MEC-17 qui est capable d'acétyler les microtubules aussi bien chez *Tetrahymena*, *C. elegans*, Zebrafish ou des cellules Ptk2 (Akella *et al.* 2010). Deux enzymes qui déacétylent l' $\alpha$ -tubuline *in vitro* et *in vivo* ont été identifiées : l'histone déacétylase 6 (HDAC6) et Sirt2 (Silent information regulator 2) (Hubbert *et al.* 2002; North and Verdin 2004). L'inhibition d'HDAC6 entraîne une hyperacétylation du réseau de microtubules qui s'accompagne d'un recrutement massif sur le microtubule des moteurs kinésine-1 et dynéine (Reed *et al.* 2006; Dompierre *et al.* 2007). Il a par ailleurs été montré au laboratoire que l'acétylation de la tubuline est impliquée dans le recrutement sur les microtubules de la protéine chaperonne Hsp90 et que ce recrutement influence le fonctionnement de voies de signalisation qui mettent en jeu des protéines clientes d'Hsp90, aussi bien au niveau cytoplasmique avec Akt/PKB et p53 (Giustiniani *et al.* 2009b) que membranaire, sur le *trans*-Golgi network avec la NO-synthase endothéliale (Giustiniani *et al.* 2009a). Il a enfin été démontré au laboratoire, pour la première fois, que l'acétylation de la tubuline est induite physiologiquement lorsque les cellules sont soumises à un stress génotoxique (Giustiniani *et al.* 2009b), est nécessaire à la stimulation de l'autophagie en réponse à une privation de nutriments (Geeraert *et al.* 2010). Cette inductibilité permettrait à la cellule de coordonner et d'organiser la réponse au stress autour des microtubules.

#### III.4.3.4. Le cycle de Détyrosination/ Tyrosination

Le cycle de détyrosination/tyrosination est une modification post-traductionnelle qui consiste en un clivage/ajout d'une tyrosine en position 451 de la région C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline. La détyrosination a lieu après l'assemblage de la tubuline en microtubules. La tubuline ainsi détyrosinée expose un résidu glutamate en position 450 et est alors appelée Glu-tubuline (Figure 5). La tyrosine clivée peut ensuite être réintégrée, mettant alors en jeu un cycle de détyrosination/tyrosination (Westermann and Weber 2003). Comme pour l'acétylation, cette modification n'est pas à l'origine de la stabilisation des microtubules mais est utilisée comme marqueur de la population de microtubules stables (Webster *et al.* 1990).

Ce cycle de détyrosination/tyrosination joue un rôle dans le recrutement sur le microtubule de différentes protéines comme les moteurs moléculaires et certains peptides localisés aux extrémités du microtubule. En effet, la tyrosine C-terminale de la tubuline est nécessaire au recrutement de kinésines de la famille des kinésines-13, telles que MCAK, favorisant la dépolymérisation des microtubules (Peris *et al.* 2009) (voir III.5.2.1 Les kinésines, un trafic vers la périphérie ).

#### III.4.3.5. Nitrotyrosination

La nitrotyrosination est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un groupement nitrate sur un résidu tyrosine (NO<sub>2</sub>Tyr) dans la région C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline. Cette modification catalysée par la tubuline-tyrosine ligase, qui semble être irréversible, conduit notamment à l'arrêt de la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire en phase G1/S et entraîne l'inhibition de l'interaction de la dynéine avec les microtubules (Phung *et al.* 2006).

#### III.4.3.6. Polyglycylation

La polyglycylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un nombre variable de 3 à 34 résidus glycine sur les résidus glutamate de l'extrémité carboxy-terminale des isoformes d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline. Contrairement à la polyglutamylation, cette modification est majoritairement abondante au niveau des axonèmes des cils et des flagelles. La fonction de la polyglycylation reste encore peu comprise, néanmoins elle est réversible et semble jouer un rôle important dans les fonctions ciliaires (Dossou *et al.* 2007). En effet, la mutation des sites de polyglycylation sur la  $\beta$ -tubuline du protozoaire *Tetrahymena* entraîne une diminution de la taille des cils et une perturbation de l'assemblage des microtubules (Thazhath *et al.* 2004; Dossou *et al.* 2007).

#### III.4.3.7. Polyglutamylation

La polyglutamylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un ou plusieurs résidus glutamate sur un des différents résidus glutamate situés à l'extrémité carboxy-terminale de l' $\alpha$ - et de la  $\beta$ -tubuline : Glu445 d' $\alpha$ 1A/B-tubuline (Edde *et al.* 1990; Redeker *et al.* 1998), Glu443 et Glu445 d' $\alpha$ 4A-tubuline (Redeker *et al.* 1998), Glu441 de  $\beta$ I-tubuline (Mary *et al.* 1994), Glu435 de  $\beta$ II-tubuline (Redeker *et al.* 1992; Rudiger *et al.* 1992), Glu438 de  $\beta$ III-tubuline (Alexander *et al.* 1991), et Glu433 de  $\beta$ IVa-tubuline (Mary *et al.* 1994). Des études utilisant l'anticorps GT335, un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le branchement d'un résidu glutamate sur la tubuline, révèle que cette modification est particulièrement abondante dans les neurones (Wolff *et al.* 1992), au niveau des axonèmes des cils et des flagelles ainsi que des centrioles et du fuseau mitotique (Fouquet *et al.* 1994; Bobinnec *et al.* 1998), qui sont des structures où les microtubules sont stables (Rogowski *et al.* 2010). Le taux de polyglutamylation est en revanche très faible sur le réseau microtubulaire de la plupart des autres cellules. De plus, étant donné le nombre variable de résidus glutamate ajoutés en chaîne latérale, cette modification post-traductionnelle est une des principales explications de l'hétérogénéité isoélectrique de la tubuline neuronale (Audebert *et al.* 1993). Cependant, cette modification n'est pas restreinte aux tubulines, puisqu'elle est également retrouvée sur les protéines d'assemblage de nucléosome NAP1 et NAP2 (Regnard *et al.* 2000). Ceci

suggère que les protéines structurales de la chromatine pourraient également être régulées par cette modification.

La polyglutamylation est réversible. Des expériences utilisant des agents affectant l'état de polymérisation de la tubuline suggèrent fortement que la polyglutamylation de l' $\alpha$ -tubuline intervient préférentiellement sur les microtubules, alors que la déglutamylation, qui semble ne pas avoir de préférence pour le polymère ou l'hétérodimère, opère différemment en fonction de la longueur de la chaîne polyglutamylée. De plus, la distribution de l' $\alpha$ -tubuline polyglutamylée entre les microtubules et les hétérodimères solubles est aussi corrélée avec la longueur de la chaîne polyglutamylée. Les isoformes portant un nombre élevé de résidus glutamate (de 4 à 6), rapidement déglutamylables, sont présentes exclusivement dans la fraction microtubulaire. Les isoformes lentement déglutamylables, comprenant de 1 à 3 résidus glutamate, sont distribués uniformément entre les fractions microtubulaire et soluble. Un niveau relativement important d' $\alpha$ -tubuline à courte chaîne glutamylée est ainsi maintenu dans la cellule indépendamment de la dynamique microtubulaire (Audebert *et al.* 1993).

Longtemps inexplorée, la signification des modifications post-traductionnelles telles que la polyglutamylation commence à être étudiée et met au grand jour son implication dans différents mécanismes cellulaires comme la régulation de différentes voies de signalisation et l'apparition de certaines maladies neurodégénératives. En effet, il a été montré qu'une polyglutamylation excessive des microtubules induirait, par des mécanismes encore incompris, un phénotype de dégénérescence neuronale chez la souris, le phénotype *pcd* (Purkinje cell degeneration, un mutant naturel d'ataxie cérébelleuse) (Rogowski *et al.* 2010).

La polyglutamylation semble impliquée dans la régulation des interactions entre les microtubules et ses protéines environnantes. En effet, l'affinité de certaines protéines pour les microtubules comme les protéines tau, MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) ou encore la kinésine est modifiée en fonction du degré de polyglutamylation des microtubules (Boucher *et al.* 1994; Larcher *et al.* 1996). Cette affinité augmente lorsqu'un à trois résidus glutamate sont ajoutés à la tubuline mais elle diminue progressivement lorsque ces résidus atteignent un nombre allant de quatre à six (Bonnet *et al.* 2001). Cette différence est probablement le résultat d'un changement conformationnel de la partie C-terminale de la tubuline et peut influencer la croissance des neurites, les phénomènes de transport et la motilité des flagelles et des cils (Janke *et al.* 2005). De plus, il a été mis en évidence chez la souris que l'expression d'une  $\alpha$ -tubuline qui ne peut pas être polyglutamylée altère la fixation de la kinésine KIF1A mais pas des kinésines KIF3A et KIF5 (Ikegami *et al.* 2007). Cet exemple montre la sélectivité de cette modification post-traductionnelle pour le recrutement sur les microtubules de certaines protéines. Par contre, certaines protéines y sont insensibles comme le montre le cas de la protéine STOP (Stable Tubule Only Polypeptide), une protéine microtubulaire intervenant dans la résistance au froid et au nocodazole des microtubules (Bonnet *et al.* 2002).

#### III.4.4. Les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles de la tubuline

Nous ne détaillerons, dans cette partie, que les enzymes auxquelles nous nous sommes plus particulièrement intéressées dans ce travail de thèse, c'est-à-dire celles impliquées dans la polyglutamylation/déglutamylation et dans le cycle de tyrosination/détyrosination de la tubuline.

##### III.4.4.1. La Tubuline Tyrosine Ligase

La tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline est une modification post-traductionnelle qui a été étudiée depuis longtemps. Lorsqu'une Glu-tubuline est générée au cours d'un cycle de tyrosination/détyrosination (à ne pas confondre avec une tubuline polyglutamylée), la tyrosine C-terminale peut être réintégrée par une réaction ATP-dépendante sous l'action d'une Tubuline Tyrosine Ligase (TTL) (Westermann and Weber 2003). En revanche, la  $\Delta 2$ -tubuline générée par le clivage de l'avant dernier glutamate n'est plus un substrat de la TTL et échappe au cycle de tyrosination (Rudiger *et al.* 1994). Cette TTL, décrite pour la première fois dans les années 1980, a été caractérisée depuis les années 1990 (Murofushi 1980; Ersfeld *et al.* 1993; Westermann and Weber 2003).

De façon intéressante, il semble que la TTL se comporte comme un suppresseur de tumeur. En effet, elle est sous-exprimée dans certains cancers animaux et humains. L'inhibition de la TTL et la détyrosination massive de la tubuline qui en résulte sont associées à une augmentation de l'agressivité tumorale (Mialhe *et al.* 2001). Chez la souris, la suppression de TTL, qui induit une détyrosination massive, provoque une désorganisation létale des circuits neuronaux (Erck *et al.* 2005). Or, il a récemment été montré *in vitro* que la détyrosination des microtubules inhibe le désassemblage des microtubules en empêchant l'interaction de la kinésine dépolymérisante MCAK avec les microtubules (Peris *et al.* 2009), et que la surexpression de MCAK contribue à la résistance au Taxol (Ganguly *et al.* 2011a). Il apparaît donc que le fonctionnement du cycle de tyrosination/détyrosination affecte des fonctions et des voies de signalisation cellulaires impliquées de manière centrale dans la progression tumorale.

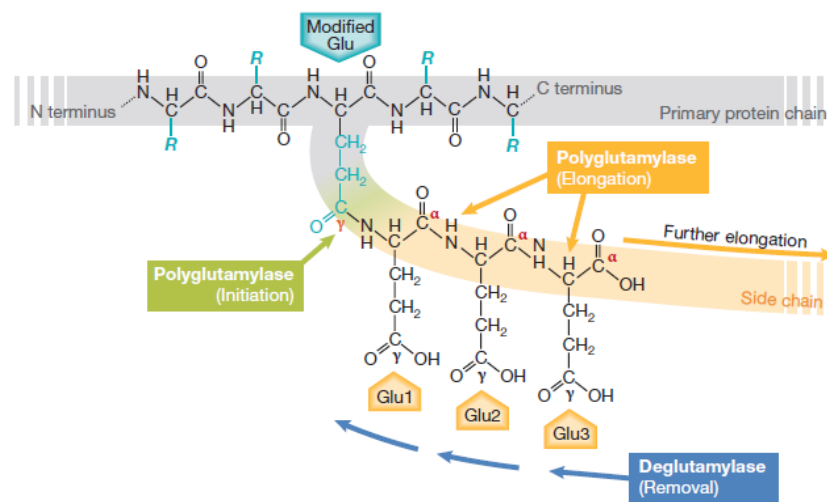
##### III.4.4.2. Les Tubuline Tyrosine Ligases-Like, des polyglutamylases

Dans le cas de la polyglutamylation, des chaînes latérales de glutamate de longueur variable sont formées en deux étapes biochimiquement distinctes : une réaction d'initiation et une réaction d'élongation. Le premier résidu glutamate est ajouté lors de l'étape d'initiation par la formation d'une liaison covalente ATP-dépendante entre son groupement amine et le groupement  $\gamma$ -carboxyle d'un glutamate modifié de la tubuline, sous l'action d'une polyglutamylase initiatrice, récemment identifiée comme étant un des membres de la famille des Tubuline Tyrosine Ligases-Like (TTLLs). Des étapes



d'élongation sont ensuite responsables de la formation de chaînes latérales de résidus glutamate de longueur variable, par liaison au niveau du groupement  $\alpha$ -carboxyle du résidu précédent, sous l'action d'une polyglutamylase élongatrice (Redeker *et al.* 1991; Wolff *et al.* 1994) (Figure 6).

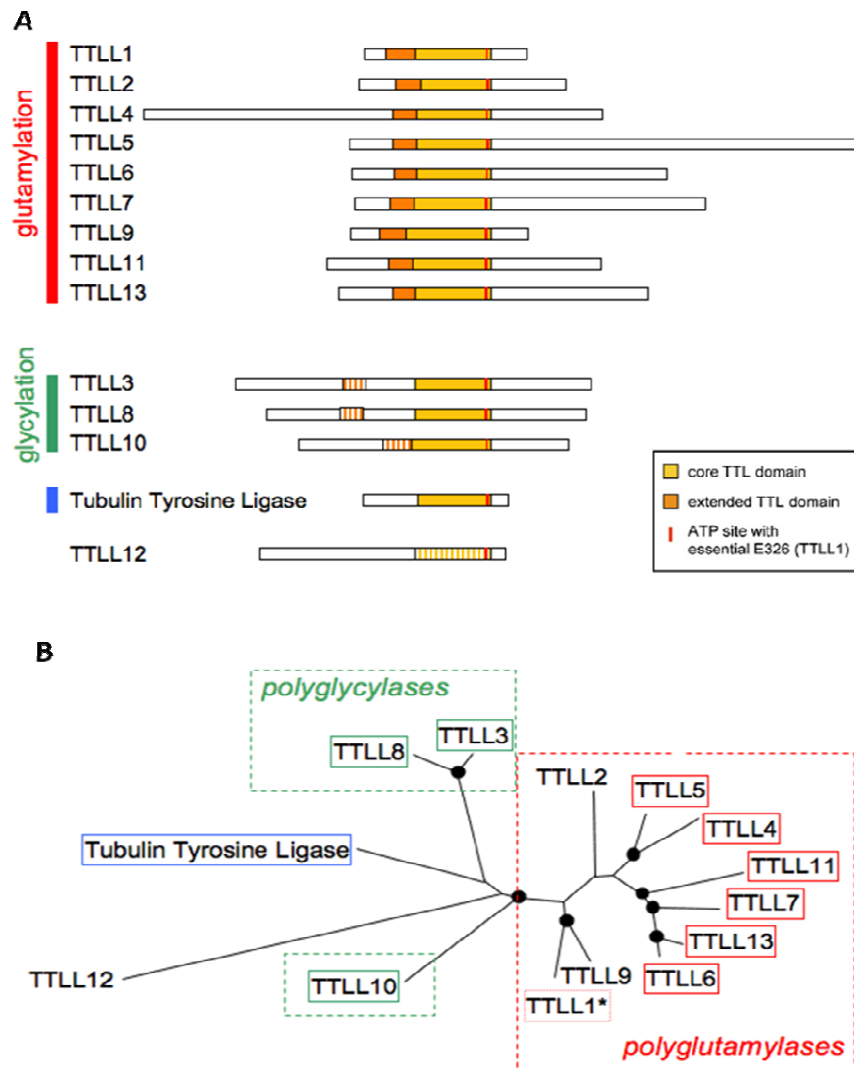
Par ailleurs, il semble que la polyglutamylation de l' $\alpha$ -tubuline précède celle de la  $\beta$ -tubuline, montrant alors que les fonctions des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  polyglutamylées ainsi que les polyglutamylases correspondantes sont différentes (Fukushima *et al.* 2009).



**Figure 6 : Mécanismes de polyglutamylation et déglutamylation**

(Janke *et al.* 2008)

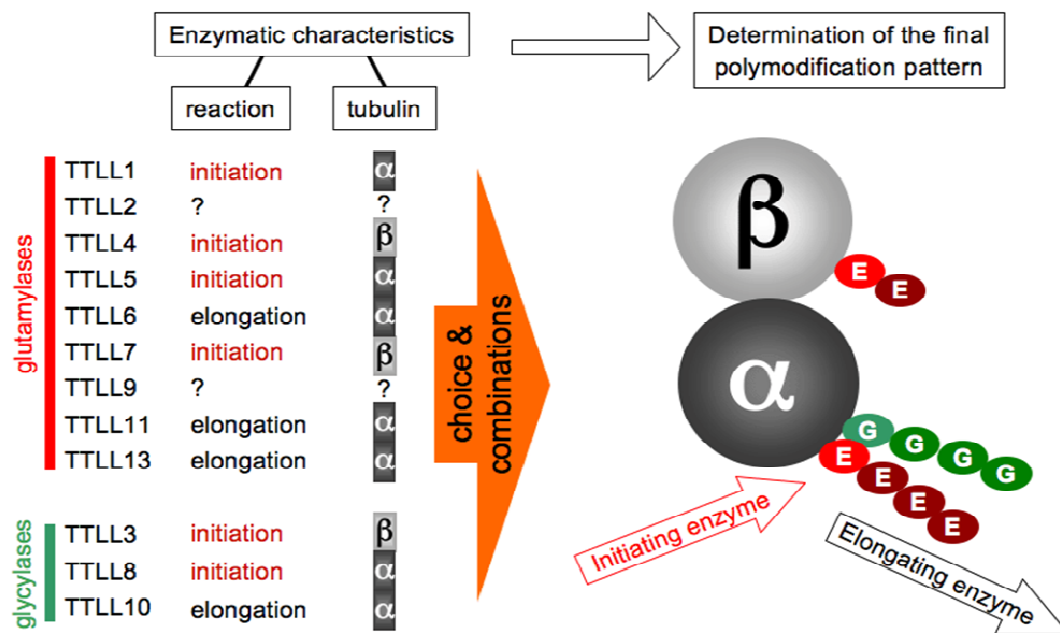
La famille des polyglutamylases, les TTLLs, compte 13 membres (Figure 7 A). L'alignement des séquences montre que ces enzymes présentent toutes un domaine catalytique central en partie homologue à celui retrouvé chez l'enzyme TTL (Tubuline Tyrosine Ligase) impliquée dans la réintégration d'un résidu tyrosine à l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline dans le cycle de tyrosination/détyrosination (Janke *et al.* 2005). Toutes les TTLLs, sauf TTLL12, contiennent ce domaine central conservé, qui semble essentiel à la réaction d'hydrolyse de l'ATP, suggérant une réaction enzymatique similaire pour toutes ces TTLLs (van Dijk *et al.* 2007).



**Figure 7 : La famille des TTLs**

**A** : Représentation schématique des 13 TTLs et TTL décrites chez la souris indiquant le domaine central TTL et le domaine catalytique potentiel commun à toutes ces protéines, **B** : Arbre phylogénétique des TTLs de mammifères. (Modifié d'après <http://perso.curie.fr/Carsten.Janke/> et van Dijk *et al.* 2007).

Parmi ces enzymes, TTL1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11 et 13 sont fortement homologues et majoritairement impliquées dans les réactions soit d'initiation soit d'élongation de polyglutamylation de l' $\alpha$  ou  $\beta$ -tubuline. TTL3, 8 et 10 sont des polyglycylation, catalysant l'ajout de résidus glycine à l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline (Figure 7 B). Ainsi, TTL1, 4, 5 et 7 seraient des polyglutamylation initiatrices de chaîne latérale, alors que TTL6, 11 et 13 seraient des polyglutamylation élongatrices de chaîne latérale (van Dijk *et al.* 2007; Wloga and Gaertig 2010). Chaque enzyme est spécifique d'un substrat,  $\alpha$  ou  $\beta$ -tubuline, et catalyse une réaction préférentielle, initiation ou élongation (Figure 8). Cependant, à saturation de la réaction préférentielle par des concentrations élevées en enzymes, la tubuline la moins favorable peut à son tour être modifiée (van Dijk *et al.* 2007).



**Figure 8 : Préférences réactionnelles et de substrat des 13 TLLs connues**

(Modifié d'après <http://perso.curie.fr/Carsten.Janke/> et Wloga and Gaertig 2010)

#### ◆ TLL1 neuronale

TLL1, la première polyglutamylase neuronale identifiée, a été purifiée à partir du cerveau de souris et semble faire partie d'un complexe contenant les protéines p32, p33, p49, p79 et p24, qui ont par la suite été nommées respectivement PGs1 (polyglutamylase subunit 1), PGs2, PGs3, PGs4 et PGs5 (Janke *et al.* 2005). La séquence de la protéine TLL1 humaine a été caractérisée et est orthologue à celle de la PGs3 murine (Trichet *et al.* 2000). TLL1 semble être la sous-unité catalytique de ce complexe enzymatique, mais les sous-unités additionnelles seraient requises pour son activité polyglutamylase, ce qui peut être un facteur limitant *in vivo*. Cependant, la déplétion de l'ARNm de TLL1 dans des cellules PC12-E2 inhibe la croissance des neurites, suggérant un rôle essentiel dans la neurogenèse. De même, des expériences utilisant des souris ROSA22 mutantes, déficientes en PGs1, démontrent que l'absence de la polyglutamylation de l' $\alpha$ -tubuline de neurones *in vivo* due à la mutation est associée à un adressage anormal de la kinésine KIF1A, modulant ainsi la transmission synaptique (Ikegami *et al.* 2007).

### ◆ TTLL et motilité ciliaire

De plus, des expériences avec des cellules TTLL1-null montrent un phénotype normal mais avec une forte diminution de polyglutamylation de certains microtubules chez le protiste cilié *Tetrahymena thermophila* (Janke *et al.* 2005). En effet, la glutamylation de la tubuline a d'abord été impliquée dans la motilité ciliaire, étant donné que l'utilisation d'anticorps anti-protéines glutamylées inhibe la motilité des flagelles (Gagnon *et al.* 1996). Des mutants déficients en TTLL9 chez *Chlamydomonas* ou en TTLL6 chez *Tetrahymena*, deux polyglutamylases élongatrices (van Dijk *et al.* 2007), ont une motilité cellulaire (flagelle/cil-dépendante) grandement diminuée bien que présentant des axonèmes normaux. Chez les protistes, l'assemblage des axonèmes est possible avec une tubuline présentant des courtes chaînes latérales de glutamate alors que la motilité ciliaire nécessite leur élongation (Suryavanshi *et al.* 2010).

### ◆ TTLL et dynamique microtubulaire

Par ailleurs, la polyglutamylation de la tubuline peut également influencer sur la dynamique microtubulaire. Alors que la surexpression de TTLL6 chez *Tetrahymena thermophila* conduit à l'accumulation de microtubules résistants à la dépolymérisation par le nocodazole (Wloga *et al.* 2010), un effet déstabilisateur de cette modification post-traductionnelle a été mis en évidence dans les cellules HeLa à travers la régulation de la katanine (McNally and Vale 1993) ou de la spastine (Hazan *et al.* 1999; Lacroix *et al.* 2010), des facteurs impliqués dans la rupture des microtubules en petits fragments et donc dans leur dépolymérisation. De même, la surexpression de TTLL11 dans les cellules HeLa augmente l'activité de la spastine, une enzyme favorisant la fragmentation des microtubules (Lacroix *et al.* 2010).

Exprimée majoritairement dans les cellules nerveuses, TTLL7 est une polyglutamylase spécifique de la  $\beta$ -tubuline, qui est nécessaire à la croissance des neurites enrichis en protéine stabilisatrice de microtubules MAP2 (Ikegami *et al.* 2006). Chez les mammifères, cette TTLL possède une activité initiatrice mais aussi élongatrice (Mukai *et al.* 2009).

Les polyglutamylases récemment découvertes mettent en évidence l'importance de la polyglutamylation dans les fonctions des microtubules. Et la redondance fonctionnelle de ces enzymes en démontre davantage leur rôle crucial. Cependant, la redondance fonctionnelle de certaines de ces enzymes pourrait potentiellement poser problème pour l'étude de la polyglutamylation de la tubuline. L'identification d'enzymes qui réversent cette modification, les déglutamylases, pourrait favoriser les études fonctionnelles en fournissant des outils expérimentaux additionnels permettant de contrer la polyglutamylation.

### III.4.4.3. Les Cytosolic CarboxyPeptidases, des déglutamylases

La polyglutamylation est un phénomène réversible finement régulé. Des études très récentes montrent que la déglutamylation est catalysée par des déglutamylases appartenant à la famille des CarboxyPeptidases Cytosoliques (CCPs) (Kimura *et al.* 2010; Rogowski *et al.* 2010). La modélisation des CCPs suggère que le domaine carboxypeptidase se replie en une structure qui ressemble aux métallo-carboxypeptidases de la famille M14 (Kalinina *et al.* 2007).

Trois enzymes, CCP1, 4 et 6, raccourcissent les chaînes latérales polyglutamylées alors qu'une quatrième enzyme, CCP5, enlève spécifiquement le premier glutamate branchant. Ces deux types d'enzymes agissent de façon coopérative afin de réverser complètement la polyglutamylation (Rogowski *et al.* 2010) (Figure 9 et Figure 10). Cependant, cette étude montre également que CCP1 est incapable de débrancher les chaînes latérales générées par TTLL1, alors qu'elle est capable de cliver celles générées par TTLL6, suggérant que TTLL6 pourrait utiliser des sites d' $\alpha$ -tubuline qui seraient plus accessibles pour CCP1 que ceux modifiés par TTLL1 (Rogowski *et al.* 2010).

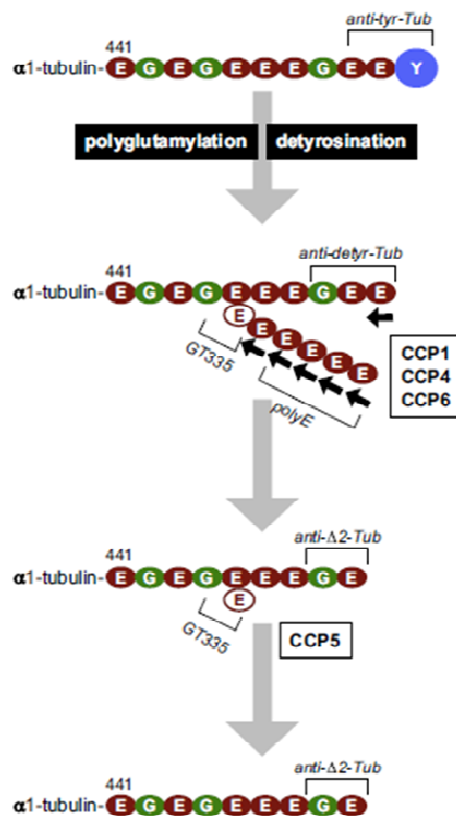


Figure 9 : Mécanisme de déglutamylation

(Rogowski *et al.* 2010)

#### ◆ CCP1, une tubuline tyrosine carboxypeptidase et/ou une déglutamylase ?

Il a été proposé récemment, bien que cela soit encore très controversé, que CCP1, également appelée Nna1, serait la carboxypeptidase cytosolique impliquée dans la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline (Kalinina *et al.* 2007). Bien que la perte de fonction de CCP1 ait été associée au phénotype de souris *pcd* (Purkinje cell degeneration) (Wang *et al.* 2006a; Chakrabarti *et al.* 2008), les mécanismes moléculaires associés à ce phénotype demeurent incompris. Cependant, une autre étude très récente a démontré que l'inhibition de la carboxypeptidase cytosolique AGBL2 (ATP/GTP binding protein-like 2) empêche la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline, ce qui en fait une candidate de la tant recherchée tubuline tyrosine carboxypeptidase TTCP (Sahab *et al.* 2011).

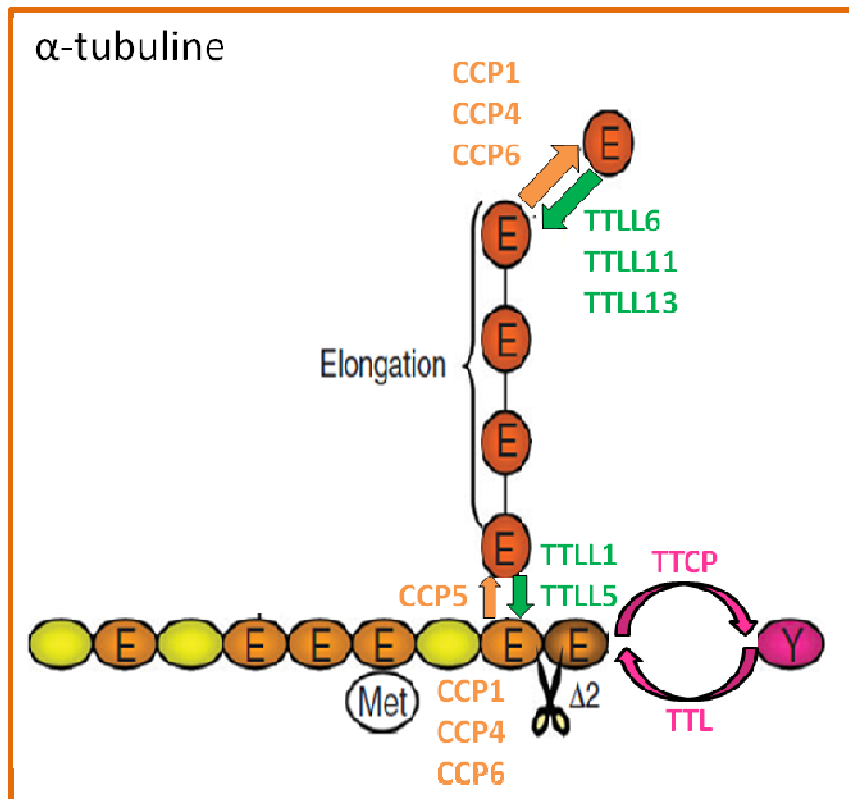
Il apparaît en revanche que CCP1 clive spécifiquement l'avant-dernier résidu glutamate de l' $\alpha$ -tubuline détyrosinée, générant de cette manière de la  $\Delta 2$ -tubuline, sans être impliquée dans la détyrosination (Rogowski *et al.* 2010). De plus, cette CCP1 permet également de raccourcir les chaînes latérales polyglutamylées générées sur la tubuline. Il s'agit donc bien d'une déglutamylase (Rogowski *et al.* 2010).

Par homologie avec CCP1, CCP4 et CCP6 permettent également de générer une  $\Delta 2$ -tubuline et de raccourcir les longues chaînes polyglutamylées (Rogowski *et al.* 2010).

#### ◆ CCP5

De récentes études concernant CCP5 ont montré qu'il s'agit également d'une déglutamylase, puisque sa surexpression dans des cellules de mammifères en culture entraîne une perte brutale de la polyglutamylation des microtubules (Kimura *et al.* 2010).

De manière intéressante, CCP5 clive spécifiquement le branchement des résidus glutamate sur la tubuline, quelle que soit la TLL impliquée dans la génération de la chaîne polyglutamylée et quelle que soit la longueur de la chaîne latérale. Elle n'est en revanche pas capable de raccourcir les chaînes latérales, ni de retirer des chaînes latérales entières, ni de générer une  $\Delta 2$ -tubuline (Rogowski *et al.* 2010).



**Figure 10 : Localisation des modifications post-traductionnelles de l'extrémité C-terminale de l'α-tubuline et enzymes impliquées dans la polyglutamylation et dans le cycle de tyrosination/détyrosination**

(Modifié d'après <http://perso.curie.fr/Carsten.Janke/> et Wloga and Gaertig 2010)

### III.5. Protéines Associées aux Microtubules

Les différentes étapes du cycle de vie des microtubules sont finement régulées par des protéines spécialisées. Les Microtubule-Associated Proteins ou MAPs (Mandelkow and Mandelkow 1995) peuvent directement influencer la dynamique des microtubules par leurs fonctions stabilisatrices ou déstabilisatrices (voir IV.3 Régulation de la dynamique microtubulaire). Parmi celles-ci, on distingue les MAPs structurales, les moteurs moléculaires (kinésine et dynéine), dont le rôle premier est le transport le long des microtubules, et les « + end Tracking Proteins » (+TIPs) qui se fixent spécifiquement à l'extrémité (+) des microtubules.

#### III.5.1. Les MAPs Structurales

Les MAPs sont des protéines filamenteuses chargées positivement qui co-purifient avec la tubuline au cours des cycles de polymérisation/dépolymérisation et qui se lient de manière réversible aux microtubules. Ainsi, les protéines neuronales Tau et MAP2 et la protéine ubiquitaire non-neuronale MAP4 présentent, au niveau de leur domaine C-terminal, un site de liaison aux microtubules assez conservé, comprenant à la fois une séquence riche en proline et une séquence de 31 acides aminés

alignés répétés 3 à 4 fois (Eiserich *et al.* 1999). Le recrutement de ces MAPs à la surface du microtubule nécessite la neutralisation de la charge négative de l'extrémité C-terminale des tubulines qui sont exposées à la surface du microtubule (Nogales 2000).

La plupart de ces protéines sont capables de moduler directement la dynamique des microtubules par un effet stabilisateur lié à leur copolymérisation avec la tubuline. Cependant, certaines d'entre elles, comme la MAP épithéliale E-MAP 115, ne semblent pas posséder ce type d'effet (Faire *et al.* 1999).

Les MAPs sont aussi impliquées dans l'organisation du réseau de microtubules, la migration neuronale, ou encore la morphogénèse cellulaire (Teng *et al.* 2001), ces fonctions étant certainement en étroite relation avec leur rôle stabilisateur. Elles possèdent également des fonctions de « cross-linkers » avec les autres microtubules ou avec d'autres éléments du cytosquelette (filaments d'actine, filaments intermédiaires). Cependant, des études récentes suggèrent que certaines de ces MAPs pourraient jouer un rôle d'espaceurs entre les microtubules, permettant ainsi de laisser l'accès libre aux vésicules de trafic membranaire (Marx *et al.* 2000).

### III.5.2. Les MAPs Motrices ou Moteurs moléculaires

Les MAPs motrices ou moteurs moléculaires sont des protéines capables d'hydrolyser un ATP et coordonnent ce cycle catalytique avec des changements conformationnels permettant de produire un travail moteur et de transporter des chargements dans le cytoplasme, généralement de façon unidirectionnelle (Figure 11). Elles sont ainsi impliquées dans de nombreuses étapes du trafic membranaire, dans la répartition des organites au sein du cytoplasme, et ont aussi des effets stabilisateurs ou déstabilisateurs de la dynamique des microtubules.

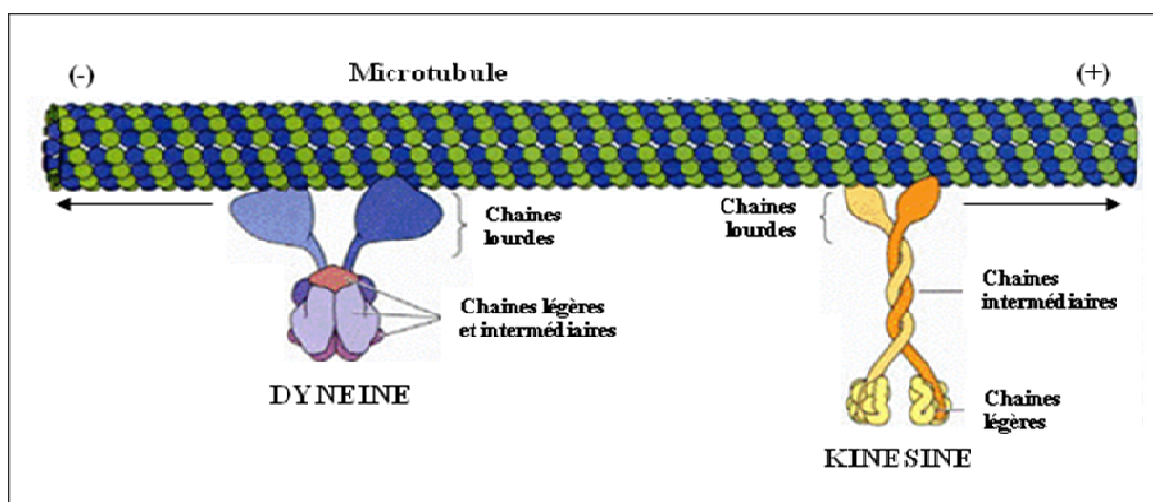


Figure 11 : Les deux superfamilles de moteurs moléculaires, dynéine et kinésine

(Cooper 2000)



### III.5.2.1. Les kinésines, un trafic vers la périphérie cellulaire

La famille des kinésines, encore appelées KIFs, regroupe des molécules présentant une forte homologie au niveau de leur domaine de liaison aux microtubules et à l'ATP (Goldstein and Philp 1999). La kinésine conventionnelle ou kinésine-1 est le premier moteur de la famille des kinésines à avoir été identifié (Vale *et al.* 1985). La kinésine-1 se présente sous forme de tétramère hydrosoluble composé de deux chaînes lourdes (KHCs) de 120kDa dont les extrémités C-terminales sont associées à deux chaînes légères (KLCs) de 64kDa (Figure 11). La combinaison d'approches biologiques et phylogénétiques a permis de mettre en évidence 45 KIFs dans les génomes humains et murins. Cependant, chaque kinésine ayant été identifiée indépendamment et nommée selon des critères variés, une nomenclature standardisée a dû être établie. Ces kinésines ont ainsi été classées en 14 familles (Lawrence *et al.* 2004), parmi lesquelles on peut distinguer trois grands groupes selon la position du domaine moteur : en N-terminal plus fréquemment (kinésine-N), au milieu (kinésine-M) ou en C-terminal (kinésine-C) de la protéine (Hirokawa and Takemura 2003). D'après des tests de motilité menés *in vitro*, qui ont été réalisés sur de nombreuses kinésines, il semble que les kinésines de type N et M se déplacent vers l'extrémité (+) des microtubules (ce qui est le cas, par exemple, de la kinésine conventionnelle ou kinésine-1) et que les kinésines de type C se déplacent vers l'extrémité moins des microtubules (Vale *et al.* 2000).

#### ◆ La kinésine-1 et les kinésines apparentées

La kinésine-1, comme toutes les kinésines conventionnelles jusque là caractérisées et qui sont processives, est capable d'effectuer de longues distances le long des microtubules sans s'en dissocier (Howard *et al.* 1989; Howard 1996). Le mécanisme de déplacement de la kinésine le long du microtubule nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par pas (Coy *et al.* 1999). Il semble que l'activité de la kinésine-1 soit régulée principalement par un mécanisme « on-off » dans lequel le moteur est actif lorsqu'il est lié à son chargement et inactif lorsqu'il est libre de tout chargement. Des études d'immunolocalisation ont montré que la kinésine est fortement attachée aux organites et en particulier à l'appareil de Golgi (Marks *et al.* 1994) près de l'extrémité moins des microtubules et se dissocie des organites à la périphérie cellulaire (Hirokawa *et al.* 1991). Ainsi, le moteur « tomberait » du microtubule à l'extrémité (+) (Haimo 1995). Une des possibilités de régulation de la kinésine-1 s'exerce via l'interaction entre la tête et la queue de celle-ci. Lorsque le moteur n'est pas attaché à une cargaison, la queue globulaire peut se replier sur la tête pour bloquer l'activité ATPase (Woehlke and Schliwa 2000).

### ◆ Les kinésines dépolymérisantes

Des kinésines dépolymérisantes, comme les protéines de la famille des kinésines-8, -13 ou -14, facilitent la dépolymérisation de la coiffe GTP et stimulent ainsi les catastrophes durant la mitose ou l'interphase (voir IV.2.3 L'instabilité dynamique) (Kinoshita *et al.* 2006; Moores and Milligan 2006; Wu *et al.* 2006; Howard and Hyman 2007; Rizk *et al.* 2009).

MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin), de la famille des kinésines-13, couple l'hydrolyse de l'ATP à la suppression de dimères de tubuline-GTP aux deux extrémités du microtubule (Moores and Milligan 2006). Suite à la dissociation d'un dimère de tubuline de l'extrémité du microtubule, les produits de l'hydrolyse d'ATP (ADP et Pi) sont libérés et le moteur se décroche. De cette façon, MCAK enlève la coiffe GTP, ce qui conduit à un phénomène de catastrophe, et le microtubule qui était en phase de polymérisation entre alors en phase de dépolymérisation. MCAK est donc une dépolymérase ATP-dépendante, qui agit comme un facteur de catastrophe (Newton *et al.* 2004). De plus, MCAK perturbe l'organisation du fuseau mitotique et régule la dynamique microtubulaire de façon différentielle (Rizk *et al.* 2009).

### III.5.2.2. Les dynéines, un trafic en direction du noyau

Bien que certaines protéines de la famille des kinésines permettent un transport vers l'extrémité (-) du microtubule, la dynéine est le moteur majeur impliqué dans les mouvements dans cette direction.

La dynéine a été identifiée dès 1965 en tant qu'élément à l'origine de la force produite dans les axonèmes (Gibbons and Rowe 1965), et plus tard, en tant que moteur universel fonctionnant dans le cytoplasme (Paschal *et al.* 1987). Environ 15 formes de dynéines axonémales ont été impliquées dans les mouvements des cils et des flagelles de cellules eucaryotes (Sakato and King 2004), tandis que la dynéine cytoplasmique n'existe que sous deux formes : la dynéine 1b, qui sert principalement au transport à l'intérieur du flagelle, et la dynéine cytoplasmique 1 qui a une grande palette de fonctions (Pazour *et al.* 1999) : pendant la mitose (Sharp *et al.* 2000), le transport neuronal (Hafezparast *et al.* 2003), le maintien de l'appareil de Golgi (Allan *et al.* 2002) et le transport d'une grande variété de cargaisons, tels que les ARNm, les endosomes ou encore les virus.

Avec une masse moléculaire d'environ 1,2 MDa, la dynéine cytoplasmique est un complexe presque 10 fois plus grand que la kinésine-1, contenant de nombreuses sous-unités (Samsó *et al.* 1998). Elle contient deux exemplaires de la chaîne lourde, DYNC1H1, qui présentent chacune un domaine moteur globulaire et une queue N-terminale. Cette queue interagit avec les chaînes intermédiaires légères (DYNC1L1) et les chaînes intermédiaires (DYNC1I1). Les trois familles de chaînes légères se lient aux chaînes intermédiaires. Ensemble, le dimère de chaînes intermédiaires, le dimère de chaînes intermédiaires légères et des dimères des chaînes légères composent le domaine de liaison au cargo (Figure 11). Les domaines « têtes » de la dynéine sont massif (environ 520kDa) et bien plus complexe

que ceux des kinésines. Contrairement à la kinésine, la dynéine présente plusieurs sites de liaison de l'ATP dans chaque tête (Mocz and Gibbons 1996).

La dynéine est le seul moteur connu qui fasse des pas de taille variable : 8, 16, 24 ou 32nm. Il a été proposé que la réduction de la taille des pas résulte de la charge portée par le moteur. Selon ce modèle, la variation de charge modifierait la liaison de nucléotides au moteur et ceci entraînerait une rétractation du domaine en anneau, avec pour conséquence une taille de pas plus faible mais une force générée plus importante (Mallik and Gross 2004). Chaque molécule de dynéine est composée d'un grand nombre de chaînes et la liste de protéines interagissant avec ces sous-unités est impressionnante. Un certain nombre de ces protéines ont un rôle dans le recrutement de cargaisons spécifiques sur la dynéine (Karcher *et al.* 2002), d'autres jouent un rôle dans la régulation du moteur lui-même comme la dynactine. La dynéine semble être extrêmement régulée en comparaison des autres moteurs moléculaires. Elle nécessite de nombreuses protéines accessoires, telles que le complexe dynactine, pour remplir ses fonctions *in vivo* (Burkhardt *et al.* 1997). Cette liaison dynéine/dynactine peut être modulée en fonction de l'état de phosphorylation/déphosphorylation (Vaughan *et al.* 2001). Ensemble elles sont actives dans un grand nombre de processus tels que le transport axonal, les mouvements d'organites, la localisation nucléaire et la séparation des chromosomes (Allan 2000).

### III.5.3. Les « + end Tracking Proteins »

Les protéines de bout (+), ou « + end tracking proteins » (+TIPs), sont un groupe très diversifié de protéines associées aux microtubules qui contient à la fois des moteurs dépendants des microtubules et des protéines non motrices. Ce qui distingue les +TIPs des autres protéines associées aux microtubules est une accumulation spécifique à l'extrémité (+) des microtubules en croissance, d'où elles tirent leur nom (Akhmanova and Hoogenraad 2005; Honnappa *et al.* 2006; Morrison 2007). Cette localisation dynamique a été découverte en étudiant la protéine CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein-170) fusionnée à la GFP dans des cellules vivantes. Ceci a permis de voir des structures en forme de comètes coïncidant avec l'extrémité en croissance des microtubules (Perez *et al.* 1999).

Les principales +TIPs sont les protéines cytoplasmiques CLIP-170 et CLIP-115, la protéine XMAP215 de *Xenopus laevis* et les protéines CLASP (CLIP Associated Proteins), les protéines EB1 (End Binding Proteins), EB2, EB3 et CLAMP, la protéine associée à la dynactine p150(Glued), et la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli). Chacune de ces protéines possède une structure caractéristique et une ou plusieurs région(s) de liaison au microtubule. Elles sont ubiquitaires dans les cellules eucaryotes. Ces nombreuses +TIPs ont une fonction de stabilisation/sauvetage des microtubules. Il est maintenant admis que les kinésines dépolymérisantes, telles que MCAK, font aussi partie des +TIPs. Cette dernière joue un rôle déstabilisateur des microtubules (voir IV.3.1 Protéines stabilisatrices, et IV.3.2 Protéines déstabilisatrices).

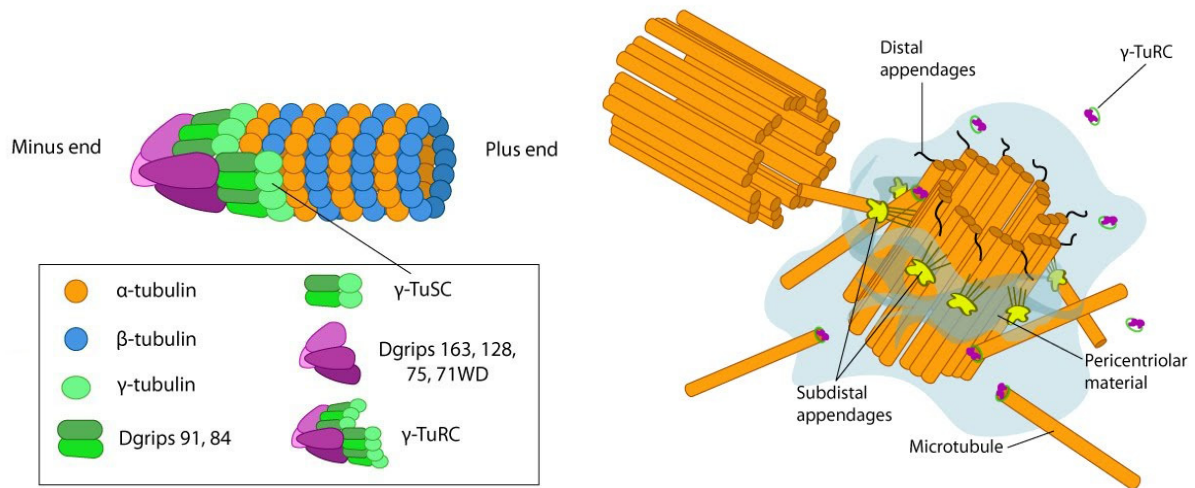
## IV. DYNAMIQUE MICROTUBULAIRE ET REGULATION

### IV.1. Nucléation

Les microtubules font l'objet d'un perpétuel remaniement et sont constamment soumis à des cycles de polymérisation/dépolymérisation (Hyman and Karsenti 1998). Ils sont donc en équilibre dynamique constant avec un pool de tubuline soluble. *In vitro*, les caractéristiques d'assemblage de la tubuline pure, en l'absence de MAPs, peuvent être définies selon différentes concentrations minimales. Une concentration inférieure à 10 $\mu$ M permet une croissance transitoire des microtubules. Aucun assemblage n'est possible en l'absence de centrosomes ou d'autres sites de nucléation. Une concentration comprise entre 10 et 20 $\mu$ M permet une croissance indéfinie des microtubules, mais uniquement à partir de centres nucléateurs. Enfin, une concentration comprise entre 20 et 40 $\mu$ M permet un assemblage spontané des microtubules, par une nucléation dite extra-centrosomale. On se trouve ainsi en présence d'une population hétérogène de microtubules à nucléation centrosomale et extra-centrosomale (Hyman and Karsenti 1998).

#### IV.1.1. Nucléation centrosomale

Dans les cellules animales, il existe une structure spécialisée, appelée centrosome, qui permet la nucléation des microtubules et organise leur distribution pendant l'interphase et la mitose. Le centrosome est formé d'une paire de centrioles entourés de matériel péricentriolaire contenant entre autre de la péricentrine et de la  $\gamma$ -tubuline (DICTENBERG *et al.* 1998). Concentrée sous la forme d'un anneau spiralé au niveau du centrosome, la  $\gamma$ -tubuline sert ainsi de matrice à la polymérisation des microtubules. Elle fait partie, avec d'autres protéines appelées « grips » (gamma-ring proteins) (MARTIN *et al.* 1998), du complexe  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin Ring Complex) qui agit comme un site de nucléation au niveau de l'extrémité (-) des microtubules (ZHENG *et al.* 1995). Ce complexe serait composé de 13 molécules de  $\gamma$ -tubuline s'associant chacune à un dimère d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline. Certains auteurs ont d'ailleurs suggéré que la polarité du microtubule et le nombre de protofilaments rencontrés *in vivo* seraient déterminés au niveau du centrosome, par ce complexe  $\gamma$ -TuRC (OAKLEY 1995) (Figure 12).



**Figure 12 : Complexe  $\gamma$ -TuRC et Nucléation centrosomale**

#### IV.1.2. Nucléation extra-centrosomale

*In vivo*, les microtubules ne sont pas liés exclusivement aux centrosomes. De nombreuses études menées sur plusieurs types cellulaires de mammifères ont montré un large déploiement de microtubules extra-centrosomaux (Keating and Borisy 1999). Cette nucléation extra-centrosomale peut être générée soit :

- par auto-assemblage de microtubules stabilisés par des protéines cytoplasmiques du même type que les MAPs (Mandelkow and Mandelkow 1995)
- à partir des sites de nucléation extra-centrosomaux (Rodionov and Borisy 1997)
- par clivage des microtubules centrosomaux préexistants par un facteur comme la katanine (McNally *et al.* 1996)
- par relargage des microtubules à partir du centrosome (Belmont *et al.* 1990).

Au laboratoire, il a été mis en évidence sur des lignées cellulaires hépatiques (WIF-B et Fao) l'implication de l'appareil de Golgi dans la nucléation extra-centrosomale de microtubules, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. La présence de  $\gamma$ -tubuline sur la face cytoplasmique du Golgi permet la nucléation de microtubules en présence de facteurs cytosoliques (Chabin-Brion *et al.* 2001).

## IV.2. Dynamique microtubulaire

Les microtubules formés sont intrinsèquement labiles, et consomment de l'énergie pour assurer des échanges actifs entre leurs sous-unités constitutantes et les dimères de tubuline soluble qui les entourent. Cet échange se produit selon deux modalités : le « treadmilling » et l'instabilité dynamique. Ces deux comportements ont aussi été observés *in vivo* dans les cellules.

### IV.2.1. La concentration critique en tubuline

La concentration critique en tubuline est la concentration en tubuline au-delà de laquelle les microtubules sont capables de polymériser (Mitchison and Kirschner 1984). La concentration critique de tubuline est plus basse pour l'extrémité (+) que pour l'extrémité (-) d'un microtubule. En moyenne, la concentration critique pour la tubuline pure se situe vers 10  $\mu\text{M}$  et s'abaisse à 1-3  $\mu\text{M}$  pour un mélange tubuline-MAPs. Par ailleurs, la présence de centrosomes permet de nucléer des microtubules bien en dessous de la concentration critique, vers 3-4  $\mu\text{M}$ . La vitesse d'assemblage des microtubules et leur longueur sont par ailleurs fonction de la concentration totale en sous-unités de tubuline.

### IV.2.2. Le treadmilling

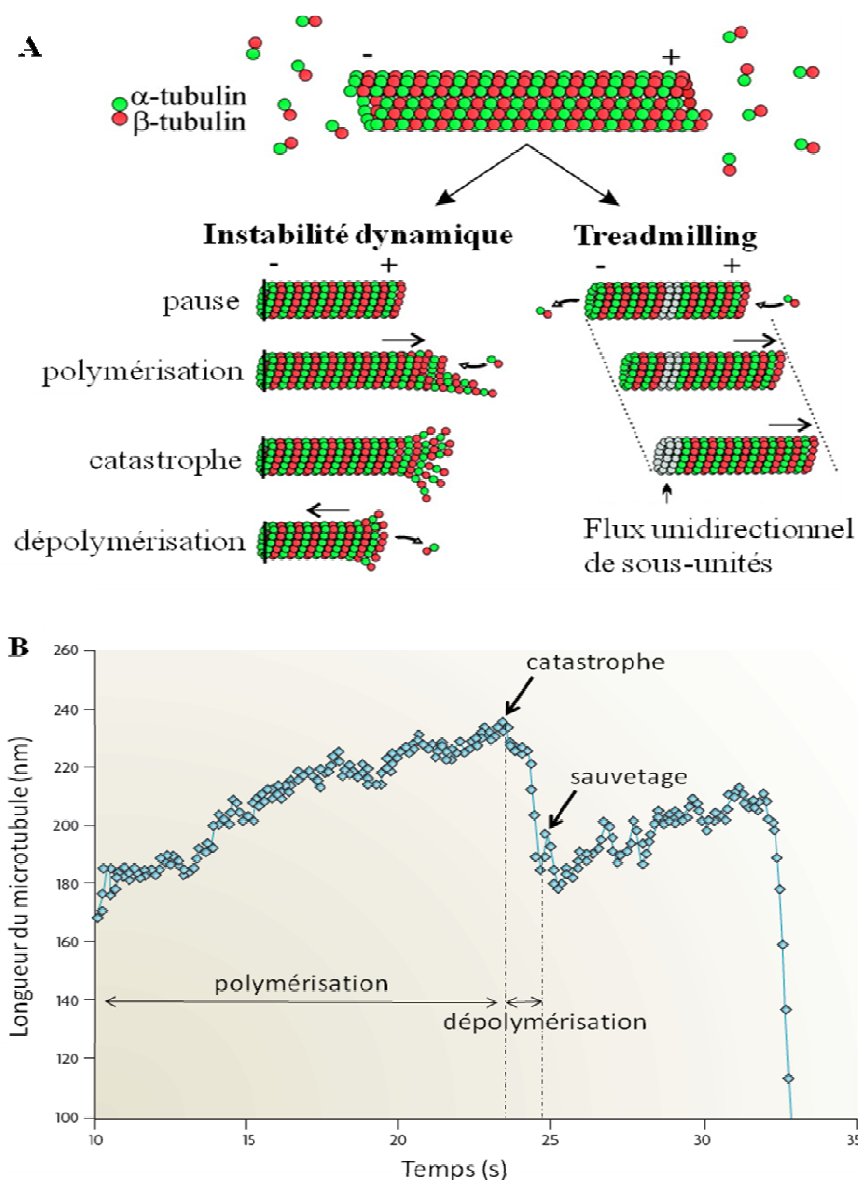
Le « treadmilling » (ou phénomène du tapis roulant) résulte d'une croissance avec incorporation constante de sous-unités à l'extrémité (+) et d'un raccourcissement avec perte de sous-unités à l'autre extrémité du microtubule. Ce phénomène a été initialement découvert *in vitro* (Margolis and Wilson 1978) et a pu être mis en évidence pour des microtubules extra-centrosomaux qui se détachent de leurs sites de nucléation et se déplacent vers la périphérie cellulaire, sans l'aide de moteurs moléculaires (Yvon and Wadsworth 1997). Dans les axones géants de calmar, il a aussi été montré que des molécules de tubuline sont transportées sous forme de grands complexes de tubuline oligomérique et de kinésine. Ces complexes sont clairement distincts des microtubules existants. Ceci est aussi assimilable à un mécanisme de treadmilling *in vivo* (Terada *et al.* 2000) (Figure 13 A).

### IV.2.3. L'instabilité dynamique

Initialement décrite *in vitro* (Mitchison and Kirschner 1984), l'instabilité dynamique consiste en une alternance de phases de polymérisation lente et de phases de dépolymérisation rapide, d'une façon non concertée entre les deux extrémités d'un même microtubule et entre microtubules différents. Les cycles de polymérisation/dépolymérisation sont entrecoupés par des phases de transitions abruptes, appelées catastrophe (vers un raccourcissement) et sauvetage (vers une reprise de l'élongation) (Desai and Mitchison 1997) (Figure 13 A et B). Le maintien à l'extrémité (+) du microtubule d'une région

constituée de tubuline-GTP (sous forme d'une coiffe) est une structure stabilisatrice importante dans la prévention des phénomènes de catastrophe. Un anticorps recombinant dirigé spécifiquement contre la tubuline dans sa conformation GTP a été isolé au laboratoire et a permis de mettre en évidence des zones contenant de la tubuline-GTP non hydrolysée non seulement à l'extrémité (+) mais également le long du microtubule (dénommés « remnants ») suggérant la présence de points de sauvetage d'où un microtubule pourrait redémarrer sa polymérisation (Dimitrov *et al.* 2008).

*In vivo*, l'instabilité dynamique se manifeste davantage au pôle (+) des microtubules qu'au pôle (-) (Gelfand and Bershadsky 1991). Les propriétés dynamiques de l'extrémité (-) sont par ailleurs amoindries par la liaison au centrosome. Cependant, certains travaux ont mis en évidence l'existence d'une instabilité dynamique spécifique du pôle (-). Cette dynamique serait probablement liée à un relargage de microtubules à partir du centrosome mais elle dépend beaucoup du type cellulaire. En effet, il existe certainement des facteurs qui, dans le cas des cellules épithéliales, stabilisent cette extrémité et dans le cas des fibroblastes, la dépolymérisent spécifiquement (McNally 1999; Rodionov *et al.* 1999). Finalement, le renouvellement des microtubules résulterait de la combinaison de ces phénomènes d'instabilité dynamique décrits à la périphérie de la cellule pour le pôle (+) et près du centre de la cellule pour le pôle (-) (Vorobjev *et al.* 1999).



**Figure 13 : Instabilité dynamique des microtubules et treadmilling**

**A** : Représentation schématique du phénomène, **B** : Vitesse de polymérisation et de dépolymérisation des microtubules (Howard and Hyman 2009)

#### IV.2.4. Cycle de vie des microtubules *in vivo*

La nature hautement dynamique des microtubules, explorant de façon continue l'espace cytoplasmique, est à la base du mécanisme par lequel la cellule peut contrôler leur distribution et leur orientation spatiale. Les microtubules ont une croissance persistante dans la partie intérieure de la cellule et une instabilité dynamique à la périphérie. Dans ce comportement dynamique des microtubules, on peut distinguer plusieurs phases : la nucléation, l'assemblage, le désassemblage et



éventuellement une stabilisation prolongée. Suite à une étude menée sur des cellules CHO et NRK, le cycle de vie suivant pour les microtubules a été proposé (Komarova *et al.* 2002b):

- les microtubules naissants croissent de façon persistante du centrosome vers la périphérie cellulaire. Ils atteignent fréquemment la périphérie sans avoir subi de catastrophe et donc de phase de dépolymérisation

- après avoir atteint la périphérie de la cellule, les microtubules subissent des transitions fréquentes entre phases de croissance et de décroissance, reflétant un processus stochastique

- un renouvellement complet des microtubules est accompli par les évènements, rares, de dépolymérisation totale jusqu'au centrosome

Les auteurs proposent un modèle selon lequel ce mécanisme permettrait au réseau de microtubules de sentir rapidement des modifications de la périphérie cellulaire. La croissance rapide et persistante permettrait aux microtubules naissants d'atteindre la périphérie cellulaire rapidement. Ainsi le squelette de microtubules d'une cellule en mouvement, dont la périphérie est en perpétuel remaniement, pourrait s'adapter rapidement aux protrusions ou changements de la forme cellulaire (Komarova *et al.* 2002b).

### **IV.3. Régulation de la dynamique microtubulaire**

La compréhension des mécanismes régulateurs de la dynamique des microtubules est encore assez fragmentée. Sur le plan moléculaire, il existe de nombreux facteurs capables d'influencer directement l'état dynamique des microtubules en modifiant leur fréquence de catastrophes et leur vitesse de polymérisation (Valiron *et al.* 2001). La polymérisation/dépolymérisation des microtubules est sous le contrôle d'un équilibre entre protéines stabilisatrices et déstabilisatrices qui se lient tout le long des microtubules (voir III.5 Protéines Associées aux Microtubules)

#### **IV.3.1. Protéines stabilisatrices**

Les protéines stabilisatrices font partie du grand groupe des protéines associées aux microtubules dénommées Microtubule Associated Proteins (MAPs) (Mandelkow and Mandelkow 1995). Celles-ci ont généralement des domaines répétés, ce qui permet à chaque molécule de s'associer avec plus d'un dimère de tubuline. Ceci produit une méthode doublement efficace pour contrôler l'assemblage des microtubules, avec d'une part la stabilisation de la conformation de plusieurs dimères de tubuline par une seule MAP, et d'autre part le pontage des sous-unités stabilisées.

#### IV.3.1.1. Tau

Tau est une des MAPs les plus étudiées. D'abord découverte dans les neurones, sa forme non phosphorylée se lie à la tubuline et favorise la polymérisation ainsi que la stabilisation des microtubules neuronaux. Lorsque tau est surexprimée *in vivo* ou ajoutée en grande quantité à des microtubules *in vitro*, elle s'accumule à la surface de ceux-ci et interfère avec le mouvement des protéines motrices (Stamer *et al.* 2002). Exprimée à des niveaux physiologiques, tau et les MAPs de cette famille aident au transport en créant de l'espace autour des microtubules (Chen *et al.* 1992). En effet, la protéine est constituée de domaines répétitifs qui se lient à la surface du microtubule permettant sa stabilisation, et d'un domaine N-terminal projeté à l'extérieur du microtubule, qui contribue à réguler l'espace entre les microtubules dans les axones et probablement leur liaison à d'autres structures telles que la membrane de l'axone (Baas and Buster 2004).

Une phosphorylation anormale de tau est retrouvée dans la maladie d'Alzheimer et d'autres pathologies (Buee *et al.* 2000) nommées tauopathies. La protéine tau s'exprime cependant dans d'autres tissus que les tissus neuronaux, dont ceux du cancer du sein (Rouzier *et al.* 2005). La perte d'expression de tau sensibilise les cellules de cancer mammaire à l'action du Taxol (Bhat and Setaluri 2007). Ceci suggère que les patientes atteintes de cancer du sein présentant une faible expression de tau pourraient être plus sensibles à des thérapies à base de Taxol que les autres patientes. Une inhibition de tau pourrait également être une stratégie pour rendre les tumeurs sensibles au Taxol, mais les mécanismes d'acquisition de la résistance au Taxol doivent cependant être pris en compte.

#### IV.3.1.2. MAP2

MAP2, d'abord caractérisée dans les expansions dendritiques de neurones différenciés, joue un rôle important dans la croissance et le développement des neurites (Sanchez *et al.* 2000). Parmi les MAPs neuronales, l'expression de MAP2 est considérée comme un marqueur de différenciation neuronale (Megiorni *et al.* 2005). A cause de son rôle stabilisateur de microtubules, une expression de MAP2 dans des cellules non neuronales entraîne la rapide formation de faisceaux de microtubules accompagnée d'un arrêt de la dynamique (Faller and Brown 2009).

Une récente étude a par ailleurs corrélé la surexpression de MAP2 à la sensibilité au Taxol dans deux lignées cellulaires du cancer du sein, permettant ainsi d'utiliser MAP2 comme biomarqueur pour le choix de thérapies néoadjuvantes utilisant le Taxol (Bauer *et al.* 2010).

#### IV.3.1.3. MAP4

MAP4 est une protéine ubiquitaire non neuronale, contrairement à tau et MAP2 (Bulinski and Borisy 1980a), qui stabilise les microtubules en augmentant la fréquence des sauvetages (transition entre une phase de dépolymérisation du microtubule et une recroissance). Elle semble impliquée dans la régulation de la dynamique microtubulaire pendant la mitose (Hyman and Karsenti 1996; Dehmelt and Halpain 2005), mais altère également les propriétés cinétiques de certains moteurs moléculaires (Mandelkow *et al.* 2004), et permet de recruter le complexe cycline B1/cdc2 kinase sur les microtubules lors de la division cellulaire (Ookata *et al.* 1995). Elle est par ailleurs impliquée dans d'autres fonctions, comme dans l'organisation et le transport d'organites et de vésicules dans les cellules interphasiques, dans l'assemblage du fuseau mitotique, ou encore dans les changements de morphologie cellulaire lors de la différenciation (Bulinski and Borisy 1980b; Parysek *et al.* 1984).

L'activité de MAP4 au sein d'une cellule est régulée par phosphorylation (Honore *et al.* 2005). Sa région N-terminale, appelée domaine de projection, comprend un grand nombre de résidus acides, et semble réguler l'espacement entre microtubules (Iida *et al.* 2002). MAP4 possède une région riche en proline (Proline-rich domain, ou PRD), contenant au moins un site de liaison au microtubule et une région permettant l'assemblage et la formation de faisceaux épais de microtubules (Aizawa *et al.* 1991). Cette région permet également la liaison de la cycline B1 et contient au moins deux sites de phosphorylation de cdk2 (Ookata *et al.* 1995). Enfin, le domaine d'assemblage en C-terminal contient de trois à cinq motifs répétés de 31 acides aminés pouvant être phosphorylés par la famille des kinases MARK/Par-1 (Drewes *et al.* 1998). Plusieurs isoformes de MAP4 peuvent ainsi être générés par épissage alternatif (West *et al.* 1991; Tokuraku *et al.* 2003). La phosphorylation de MAP4 par les kinases cdk2 ou MARK/Par-1, induisant son inactivation, inhibe la liaison de cette MAP aux microtubules, et induit sa dissociation des microtubules, ce qui favorise la mitose (Olmsted 1986; Poruchynsky *et al.* 2001). En effet, son inhibition entraîne un déplacement de l'équilibre entre les fractions solubles et polymérisées de la tubuline, en faveur de la fraction soluble, et d'une dynamique microtubulaire accrue (Drewes *et al.* 1997; Nguyen *et al.* 1999). La phosphorylation de MAP4 et sa dissociation des microtubules ont d'ailleurs été reliées à une diminution de la sensibilité au Taxol dans des lignées cellulaires de cancer ovarien résistantes au Taxol (Poruchynsky *et al.* 2001).

#### IV.3.1.4. MAP1

Les protéines MAP1A et MAP1B sont aussi des MAPs neuronales. *In vitro*, il a été montré que MAP1A, la MAP la plus abondante dans le cerveau adulte, augmente la nucléation et stimule l'élongation microtubulaire (Pedrotti *et al.* 1993; Faller *et al.* 2009), mais est moins efficace que MAP2C pour stabiliser les microtubules (Vaillant *et al.* 1998). Il semble que MAP1B puisse se substituer à tau *in vivo* puisque des souris Knock-Out sont viables sans l'une ou l'autre de ces

protéines, mais meurent si les deux protéines sont absentes (Takei *et al.* 2000). De même, la chaîne légère de MAP1B s'associe et régule négativement l'activité de p53 dans des cellules neuronales (Lee *et al.* 2008).

#### IV.3.1.5. Les autres MAPs

La plupart des MAPs sont capables de moduler directement la dynamique des microtubules par un effet stabilisateur lié à leur copolymérisation avec la tubuline. Cependant, certaines d'entre elles, comme la MAP épithéliale E-MAP 115 (également appelée ensconsin), ne semblent pas posséder ce type d'effet (Faire *et al.* 1999). Notamment dans les oocytes et œufs de Xénope, il existe au moins trois MAPs qui diffèrent d'un point de vue biochimique et fonctionnel : XMAP215, XMAP230 et XMAP310, qui sont impliqués respectivement dans l'assemblage des extrémités (+) des microtubules *in vitro* et dans l'assemblage de microtubules long et hautement dynamiques (Cassimeris and Morabito 2004), dans la stabilisation des microtubules *in vitro*, et dans l'instabilité dynamique des microtubules (Cha *et al.* 1998).

La famille des protéines STOP (Stable Tubule Only Polypeptide) est impliquée dans la stabilité des microtubules d'origine neuronale qui sont alors capables de résister au froid et aux agents dépolymérisants comme le nocodazole (Guillaud *et al.* 1998).

Contrairement aux protéines développées ci-dessus qui sont réparties sur toute la longueur des microtubules, les +TIPs, se lient spécifiquement au niveau de leur extrémité en croissance. Les protéines de la famille CLIP-170 (cytoplasmic linker protein-170) appartiennent à cette classe particulière de protéines. Bien que leur fonction exacte diffère selon les cellules considérées, la majorité sont impliquées dans la stabilisation des microtubules, soit de façon dynamique (en réduisant la fréquence des catastrophes ou en augmentant celle des sauvetages), soit en capturant les microtubules dans leur état de pause. *In vivo*, cette protéine s'associe par son domaine N-terminal à l'extrémité (+) des microtubules (Perez *et al.* 1999), en particulier lorsque les microtubules sont davantage tyrosinés (Peris *et al.* 2006). Cette liaison permet à CLIP-170 d'exercer sa fonction de facteur de sauvetage des microtubules (Komarova *et al.* 2002a). De même, il a été montré au laboratoire que la kinésine-1 et JNK, impliquées dans une même voie de signalisation, stimulent l'élongation des microtubules, et participent, en coopération avec le facteur de sauvetage CLIP-170, à l'élaboration et au maintien du cytosquelette de microtubules au sein de la cellule (Daire *et al.* 2009).

### IV.3.2. Protéines déstabilisatrices

Parmi les protéines capables de déstabiliser les microtubules, on trouve des protéines responsables des évènements de type catastrophe qui peuvent être initiés *in vitro* au niveau de l'une ou l'autre extrémité des microtubules et des sites de clivage.

#### IV.3.2.1. Les MARKs

Les MARKs (Microtubule Affinity Regulating Kinase) peuvent phosphoryler spécifiquement le domaine de liaison à la tubuline des MAPs ce qui diminue leur interaction avec les microtubules et tend à les déstabiliser. Les MARKs sont inactivées à leur tour après déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A (Drewes *et al.* 1998).

#### IV.3.2.2. L'oncoprotéine18 /Stathmine

L'oncoprotéine18, également appelée stathmine, est une petite protéine (~18Kda) ubiquitaire qui déstabilise les microtubules en augmentant la fréquence de catastrophes (Belmont *et al.* 1996). *In vivo*, la stathmine déstabiliserait les microtubules en activant l'hydrolyse de la coiffe GTP-tubuline provoquant ainsi un changement de conformation du microtubule (Walczak 2003). Cet effet résulte de la fonction de séquestration qu'exerce la stathmine sur les dimères de tubuline solubles. En effet, une molécule de stathmine s'associe à deux dimères de tubuline et cet évènement dépend de l'état de phosphorylation de cette MAP. Dans son état non phosphorylé, la stathmine séquestre des dimères de tubuline dans un complexe T2S. La phosphorylation de cette dernière se traduit par un relargage de la tubuline séquestrée, contribuant et favorisant ainsi la polymérisation des MTs. Cette séquestration permet à la cellule de moduler la concentration en tubuline soluble directement incorporable dans les microtubules et influence leur croissance et leur comportement dynamique. Il a notamment été observé *in vivo* que la phosphorylation de la stathmine en mitose atténue son activité permettant la formation du fuseau (Howell *et al.* 1999).

#### IV.3.2.3. La Katanine

D'autres protéines sont capables de couper les microtubules modifiant ainsi leur conformation et leur dynamique. C'est le cas de la katanine, une ATPase hétérodimérique localisée au niveau du centrosome qui est capable d'entraîner une dépolymérisation complète des microtubules au cours de la mitose (McNally *et al.* 2006).

#### IV.3.2.4. La Mapmoduline

La mapmoduline se lie préférentiellement aux MAPs solubles (MAP2, MAP4 et Tau) au niveau de leur domaine de liaison à la tubuline. Cette protéine est donc capable de séquestrer temporairement les MAPs hors de leurs sites de liaison le long des microtubules (Ulitzur *et al.* 1997).

#### IV.3.2.5. La protéine MINUS

*In vitro*, la protéine MINUS (Microtubule Nucleation Suppressor) inhibe l'assemblage des microtubules en présence de Taxol ou de protéine tau. Contrairement à la stathmine, l'inactivation de cette protéine se fait par déphosphorylation (Fanara *et al.* 1999).

#### IV.3.2.6. La famille des kinésine-13

La famille des kinésines-13, dont fait partie MCAK, a la capacité de dépolymériser les microtubules en se fixant sur l'extrémité (+) des microtubules. Le site de liaison au microtubule de ce type de moteur est convexe et courbe la structure du protofilament afin de le dépolymériser. Les kinésines-13 augmentent alors les phases de catastrophes et donc la dynamique des microtubules (Walczak 2003) (voir III.5.2.1 Les kinésines, un trafic vers la périphérie).

### IV.4. Spécialisation fonctionnelle des microtubules

#### IV.4.1. Microtubules stables et dynamiques

Il a été montré qu'au sein du cytosquelette de microtubules, deux types de populations coexistent : des microtubules dits « stables », dont la durée de vie est plus longue et qui subissent moins d'évènements de catastrophe et de sauvetage, et des microtubules dits « dynamiques » ou « labiles ».

Dès 1975 il a été observé que des microtubules de deux catégories coexistent dans les cellules : certains sont sensibles au froid et d'autres résistants (Brinkley and Cartwright 1975). Des études conduites ensuite en utilisant un agent dépolymérisant, le nocodazole, ont révélé le même type de disparités au sein de la population de microtubules : dans des monocytes humains, 70% de la population de microtubules est labile et subit une dépolymérisation 23 fois plus vite qu'une population mineure de microtubules plus résistants. Dans cette étude, des traitements par le froid donnent sensiblement les mêmes résultats (Cassimeris *et al.* 1986).

Il a été observé que l'aspect et la répartition des microtubules stables sont différents de ceux des microtubules dynamiques. Ainsi, les microtubules stables sont souvent plus épais, contournés et plutôt répartis à proximité du noyau et du centrosome (Schulze and Kirschner 1987).

De plus, des études biochimiques ont ensuite permis de mettre en évidence des différences structurales entre les microtubules de ces deux sous-populations. La tubuline peut subir des modifications post-traductionnelles après assemblage en polymères, comme nous l'avons vu précédemment. Elle peut être acétylée dans sa région N-terminale sur la lysine 40, subir une détyrosination (exposant ainsi un acide glutamique C-terminal pour donner la « Glu-tubuline »), subir après détyrosination la perte de l'acide glutamique terminal (donnant la  $\Delta 2$ -tubuline), être polyglycylée ou polyglutamylée et plus rarement phosphorylée ou palmitoylée (Westermann and Weber 2003). A l'exception de la formation de  $\Delta 2$ -tubuline, ces modifications post-traductionnelles sont réversibles après dépolymérisation des microtubules.

Il existe une corrélation entre modifications post-traductionnelle et stabilité des polymères, en particulier dans le cas du cycle de tyrosination/détyrosination. En effet, il a été montré dans des cellules Vero que les microtubules contenant de la tubuline détyrosinée sont moins dynamiques et résistent à des concentrations plus élevées d'agents anti-microtubulaires (Kreis 1987). Ces différences de comportement dynamique se traduisent par des demi-vies de l'ordre de 5 à 10 min pour les microtubules dynamiques, alors que les microtubules stables peuvent persister plusieurs heures voire une interphase entière. Cependant au plan fonctionnel il semble que les modifications post-traductionnelles soient une conséquence de la stabilisation des microtubules et non une cause. Ce point de vue vient récemment d'être remis en question au moins pour la détyrosination (Peris *et al.* 2009), et l'acétylation (Giustiniani *et al.* 2009a; Giustiniani *et al.* 2009b).

#### IV.4.2. Rôle dans le trafic intracellulaire

Les microtubules stables et dynamiques apparaissent spécialisés dans différentes étapes de l'endocytose. Une étude démontre que les microtubules glutamylés et la kinésine jouent un rôle important dans l'organisation du compartiment de recyclage d'endocytose (ERC) et favorisent la migration des vésicules de ce compartiment vers la surface de la cellule. En effet, le traitement des cellules CHO par le Taxol augmente la concentration des microtubules stables détyrosinés (glutamylés) et provoque la dispersion de l'ERC. De plus, la micro-injection d'anti-Glu tubuline ou d'anti-kinésine ralentit le recyclage de la transferrine concentrée dans l'ERC, sans toutefois affecter son internalisation (Lin *et al.* 2002).

Le trafic antérograde des vésicules de sécrétion entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi est lui aussi supporté par les microtubules stables. Ainsi, dans les cellules d'hépatomes humains HepG2 sécrétant de l'albumine humaine, des expériences d'immunomarquage révèlent une forte colocalisation des structures contenant l'albumine avec les microtubules glutamylés (Mizuno and Singer 1994).

Dans le cas du transport des protéines membranaires vers la membrane plasmique, l'implication des microtubules a été longtemps controversée, ceci résultant probablement de la difficulté qu'il y a à détruire la totalité des microtubules de la cellule. C'est en fait l'utilisation d'une molécule, le 201-F, qui dépolymérise sélectivement le réseau de microtubules dynamiques, qui a permis au laboratoire de répondre à cette question. Des expériences de « pulse-chase » ont en effet permis de montrer, sur des cellules hépatiques polarisées WIF-B que le trafic des protéines membranaires vers la membrane basolatérale est assuré par les microtubules stables (Poüs *et al.* 1998).

#### IV.4.3.Maintien de la cohésion des organites

Les microtubules stables interviennent dans la perte de cohésion du compartiment golgien alors que les microtubules dynamiques sont nécessaires au maintien en position juxtanucléaire de l'appareil de Golgi. En effet, la dispersion du Golgi a lieu lorsque les microtubules dynamiques sont détruits. En l'absence totale de microtubules, la localisation juxtanucléaire du Golgi peut toutefois être maintenue lorsqu'on micro-injecte de l'anti-kinésine dans les cellules. Ceci signifie que la dispersion de l'appareil de Golgi s'effectue au niveau des microtubules stables grâce à la kinésine (Minin 1997).

#### IV.4.4.Migration cellulaire

Les microtubules détyrosinés (glutamylés), stables, sont orientés dans le sens de migration des cellules fibroblastiques (Gundersen and Bulinski 1988) et participent à la migration cellulaire. Dans un système où l'addition de membranes plasmiques isolées permet de reproduire les contacts cellule-cellule, les microtubules détyrosinés disparaissent du front de migration alors que la distribution des microtubules tyrosinés n'est pas affectée. Dans ces conditions, les lamellipodes se rétractent et le mouvement migratoire des cellules est supprimé. Cet effet est réversible dès que les membranes sont éliminées du milieu de culture des cellules (Nagasaki *et al.* 1994).

#### IV.4.5.Interaction avec d'autres éléments du cytosquelette

Les microtubules stables sont responsables du recrutement et de la localisation des filaments intermédiaires. Dans des fibroblastes 3T3 en migration, les microtubules glutamylés alignent les filaments intermédiaires de vimentine. Lorsque tous les microtubules sont dépolymérisés sous l'action du nocodazole, les filaments intermédiaires s'effondrent en position périnucléaire. Après élimination du nocodazole, le redéploiement des filaments intermédiaires dans le cytoplasme ne s'effectue qu'après la reformation des microtubules glutamylés (Gurland and Gundersen 1995). De plus, l'injection de différents anticorps anti-Glu-tubuline provoque également un effondrement des filaments intermédiaires, suggérant que c'est la détyrosination de la tubuline qui servirait de signal



pour initier le recrutement des filaments intermédiaires au niveau des microtubules. Cette interaction Glu-microtubules/filaments intermédiaires se fait par l'intermédiaire de la kinésine (Liao and Gundersen 1998).

#### IV.4.6. Transduction de signal

T. Phung Koskas a démontré au cours de ses travaux de thèse au laboratoire que la différence entre microtubules stables et dynamiques peut avoir un rôle fonctionnel important dans la transduction du signal. La voie de signalisation du facteur STAT5B, un des facteurs STAT majoritairement activé lors de la stimulation des hépatocytes par l'hormone de croissance, dépend fortement et spécifiquement de la population la plus dynamique de microtubules (Phung-Koskas *et al.* 2005). Toujours au laboratoire, J. Giustiniani, au cours de son doctorat, a mis en évidence l'importance de la sous-population de microtubules acétylés dans la fonction de signalisation d'au moins 3 protéines clientes d'HSP90 : l'oncoprotéine Akt/PKB, le suppresseur de tumeur P53 (Giustiniani *et al.* 2009b) et l'enzyme endothéliale eNOS (Giustiniani *et al.* 2009a).

### V. INTERRELATIONS ACTINE-MICROTUBULES

Il existe une coopération fonctionnelle entre les microtubules et les filaments d'actine dans divers types cellulaires, notamment dans le trafic de vésicules et d'organites, la migration cellulaire, ou encore la cytokinèse.

Cependant, une question se pose : y'a-t-il interaction ou coopération entre ces deux éléments du cytosquelette ? Une interaction implique une connexion physique entre les filaments d'actine et les microtubules. Ceci nécessite la présence de protéines de pontage, ou une série d'interactions protéines-protéines. Une coopération implique que la fonction d'un élément du cytosquelette affecte indirectement certains aspects de l'autre système (Yarm *et al.* 2001).

#### V.1. Coordination mutuelle dans le transport intracellulaire

Le transport intracellulaire le long des filaments d'actine et des microtubules dépend de l'association des moteurs moléculaires, myosine pour les filaments d'actine, et kinésine et dynéine pour les microtubules. En général, les microtubules sont utilisés pour le transport sur de longues distances, et les filaments d'actine pour le transport sur de courtes distances (voir Partie I : Les Microtubules, II.3.2 Trafic intracellulaire).

Pendant de nombreuses années, il était supposé que les moteurs moléculaires transportaient des vésicules et des organites distincts le long de l'actine et des microtubules. Or une étude portant sur les axones de calamar a démontré que des organites pouvaient à la fois être transportés par l'actine et les microtubules, en passant invariablement de l'un à l'autre (Kuznetsov *et al.* 1992). Par ailleurs, il a également été démontré que les filaments d'actine sont nécessaires à la dispersion uniforme des granules pigmentaires dans les mélanophores de poisson. Ces granules semblent donc transportées par l'action coordonnée de l'actine et des microtubules. Les microtubules sont impliqués dans le mouvement rapide initial vers la périphérie cellulaire, et les filaments d'actine dans la dispersion même des granules à l'intérieur du cytoplasme (Rodionov *et al.* 1998).

Cependant, la coordination de leurs activités motrices est encore méconnue. Il semble probable que les deux activités motrices majeures soient régulées par un mécanisme plus complexe, impliquant potentiellement un rétrocontrôle entre les moteurs moléculaires et/ou une régulation différentielle de la compartimentation subcellulaire (Goode *et al.* 2000).

## V.2. Régulation de l'expansion cellulaire

L'organisation du réseau de microtubules dans une cellule en migration présente des similarités avec celui du cytosquelette d'actine. Comme l'actine, l'organisation des microtubules est polarisée lors de la migration cellulaire, avec une dynamique différente entre le bord de la cellule qui avance et le bord qui se rétracte. La corrélation entre l'organisation de l'actine et des microtubules suggère que ces deux polymères sont liés, soit directement, soit indirectement à des protéines intermédiaires ou des molécules de signalisation. Ceci suggère également que les microtubules régulent la dynamique des filaments d'actine (Etienne-Manneville 2004).

La formation des filopodes et des lamellipodes est principalement conduite par la polymérisation de l'actine, mais les microtubules participent également à la formation de ces protrusions, bien que leur contribution soit variable d'un type cellulaire à un autre. Les microtubules peuvent ainsi contribuer à la force protrusive, soit directement, soit indirectement en contrôlant des régulateurs d'actine. De plus, le mouvement cellulaire directionnel requiert des microtubules dynamiques en croissance. En effet, une étude a démontré que les extrémités en croissance des microtubules dans des cellules en migration sont ciblées et capturées aux points focaux d'actine corticale (Kaverina *et al.* 1998), impliquant un transport myosine-dépendant et une interaction *in vitro* avec la protéine CLIP-170 (Lantz and Miller 1998). Ainsi, un complexe CLIP-170/myosine pourrait relier les extrémités des microtubules directement aux câbles d'actine et promouvoir le suivi directionnel des extrémités des microtubules sur les câbles d'actine, les ciblant aux points d'adhésion focale de l'actine (Goode *et al.* 2000).

Les Rho GTPases sont des régulateurs majeurs de la morphologie cellulaire et sont impliquées dans divers processus tels que la polarisation cellulaire, la diffusion, la contraction, l'adhésion, ainsi que la migration cellulaire. Certains membres de cette famille de Rho GTPases, comme Cdc42, Rac et Rho, induisent respectivement la formation des filopodes, des lamellipodes ou des fibres de stress (Nobes and Hall 1995). De nombreuses études montrent également que les microtubules sont présents en amont et en aval de la signalisation des Rho GTPases, suggérant que les microtubules et les MAPs se situent au cœur d'un réseau complexe de mécanismes de contrôle de la signalisation régulant la morphologie cellulaire (Dehmelt and Halpain 2004).

### V.3. Coordination de la mitose et de la cytokinèse

La cytokinèse est étroitement couplée à la ségrégation des chromosomes, en termes de régulation spatiale et temporelle. Une des premières étapes de la cytokinèse est la spécification du futur site de division cellulaire, le plan de clivage devant être correctement positionné pour une bonne répartition du génome entre chaque cellule fille.

Des études sur la cytokinèse chez la levure en fission montrent un transport coordonné entre actine et microtubules. Dans les cellules animales, le plan de clivage est généralement positionné à équidistance entre les pôles mitotiques en anaphase, et le bon positionnement requiert des interactions entre les microtubules astraux et les sites corticaux (White and Strome 1996). De plus, il a été démontré que la protéine Cdc12p, un membre de la famille des formines, est nécessaire pour l'assemblage de l'anneau contractile d'actine-myosine et la complétion de la cytokinèse chez *S. pombe* (Chang *et al.* 1997) sous le contrôle de Rho GTPases. Cette protéine Cdc12p est transportée le long des microtubules et des câbles d'actine, vers le site de formation de l'anneau contractile (Chang 2000).

Par ailleurs, l'actine et les microtubules sont impliqués dans la rotation du fuseau mitotique, menant à une division cellulaire asymétrique des embryons de *C. elegans*. Les microtubules astraux interagissent avec un site cortical contenant de l'actine et des protéines de coiffe de l'actine, puis raccourcissent, causant une rotation de 90° du centrosome et du fuseau (Gonczy and Hyman 1996). Une étude a également montré que la dynactine est localisée au niveau du site de capture cortical des microtubules, et que la dynactine et la dynéine sont toutes les deux requises pour la rotation du fuseau mitotique (Skop and White 1998).

Alors que plusieurs études sur la méiose chez la Drosophile mâle indiquent clairement que la partie centrale du fuseau et l'anneau contractile sont mutuellement dépendants, le travail effectué sur des embryons de *C. elegans* et des cellules de mammifères ne fournit qu'une preuve limitée vis à vis de l'interaction coopérative de ces structures. L'intégrité du fuseau mitotique est essentielle pour l'exécution normale de la cytokinèse. Cependant, chez *C. elegans* et dans les cellules de mammifères,

le fuseau ne semble essentiel qu'à partir des derniers stades du processus de cytokinèse (Raich *et al.* 1998; Schumacher *et al.* 1998). Il a ainsi été suggéré que l'interaction entre les microtubules et les filaments d'actine corticale est l'une des premières étapes du processus de division cellulaire. Cette interaction résulte de deux événements cruciaux : le positionnement de l'anneau contractile et la formation du fuseau mitotique à travers la stabilisation des extrémités plus des microtubules. La formation du fuseau mitotique permet alors de déplacer vers la zone équatoriale de la cellule le matériel nécessaire à la cytokinèse. De ce fait, par l'intermédiaire de moteurs moléculaires de type kinésine, la partie centrale du fuseau accumule une série de polypeptides qui sont aussi bien des constituants de l'appareil mitotique que des composés de voies de signalisation qui régulent l'initiation et la progression de la cytokinèse (Gatti *et al.* 2000).

Une ou plusieurs des nombreuses protéines qui s'accumulent au niveau de la plaque équatoriale du fuseau mitotique sont susceptibles de servir d'intermédiaire dans les interactions microtubule-actine impliquées dans la formation du fuseau et de l'anneau contractile (Field *et al.* 1999). C'est le cas de certains membres de la sous-famille des kinésines MKLP1 (Mitotic Kinesin-Like Protein 1), telles que les protéines KLP3, CHO1/MKLP1, PAV-KLP et ZEN-4, qui semblent essentielles à la cytokinèse (Nislow *et al.* 1992; Adams *et al.* 1998; Powers *et al.* 1998; Raich *et al.* 1998).

D'autres candidates possibles pour cette interaction microtubule-actine sont les septines. Elles forment une famille assez conservée de protéines qui participent à une variété de fonctions cellulaires, impliquant des régions spécialisées du cortex cellulaire et des changements de morphologie cellulaire. La biochimie et la localisation des septines, qui se lient aussi bien au niveau des microtubules qu'au niveau des microfilaments d'actine, suggèrent qu'elles pourraient former un nouveau système de cytosquelette ou qu'elles agissent comme des protéines d'échafaudage pour l'assemblage de complexes de la signalisation cellulaire (Field and Kellogg 1999).



## PARTIE II : LES SEPTINES

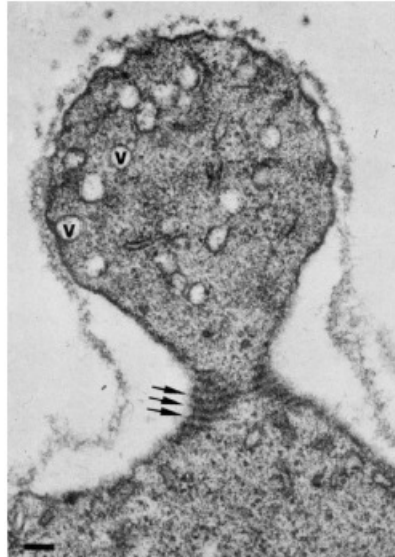
### I. STRUCTURE DES SEPTINES

#### I.1. La famille des Septines

Les membres de la famille des septines ont été identifiés pour la première fois en 1971 chez des mutants de la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* déficients lors de la cytocinèse lors d'études de mutations sensibles à la température de quatre gènes homologues CDC3, CDC10, CDC11 et CDC12, qui contrôlent le cycle cellulaire (CDC pour Cell Division Cycle) (Hartwell 1971). Des mutations au niveau d'un de ces quatre gènes, causent un arrêt du cycle cellulaire et des défauts presque identiques de la croissance des bourgeons et de la cytocinèse à une température non permissive.

Des études génétiques ont révélé que ces quatre gènes CDC codent des polypeptides similaires, chacun possédant des motifs conservés retrouvés chez les GTPases. Les quatre protéines encodées forment ainsi une famille de protéines appartenant à la superfamille des GTPases (Longtine *et al.* 1996; Field and Kellogg 1999). Elles ont été classées évolutivement dans la branche phylogénétique des NTPases à boucles-P, incluant la superfamille de moteurs du cytosquelette myosine/kinésine et la superfamille de GTPases Ras (Leipe *et al.* 2002).

Cette nouvelle famille de protéines a été nommée « septine » pour indiquer leur rôle dans la septation et la division cellulaire. Il a été montré par microscopie électronique que ces quatre septines colocalisent avec les filaments de l'anneau contractile (Figure 14) (Byers and Goetsch 1976). Ces données ont permis de démontrer que les septines en sont également des constituants majeurs et jouent un rôle central dans la cytocinèse (Longtine *et al.* 1996; Field and Kellogg 1999).



**Figure 14 : Photographie en microscopie électronique d'un bourgeon de *S. cerevisiae* indiquant la présence de septines au niveau des filaments de l'anneau contractile**

(Byers and Goetsch 1976)

## I.2. Structure générale des septines

### I.2.1. Polymorphisme

Depuis la découverte des septines chez la levure *S. cerevisiae*, des orthologues ont été identifiés chez les champignons, les nématodes, la drosophile et les mammifères, mais les septines semblent absentes chez les plantes supérieures. Le nombre de gènes codant les septines varie de deux chez *C. elegans* (nommées UNC-59 et UNC-61) à treize connus à ce jour chez l'Homme (nommés *SEPT1* jusqu'à *SEPT12* et *SEPT14*) auxquels on peut ajouter quatorze pseudogènes. Le gène *SEPT13* a en effet été redéfini comme un des nombreux pseudogènes de *SEPT7* (Russell and Hall 2011). Par ailleurs, les transcrits de nombreux gènes peuvent subir un épissage alternatif (auxquels peuvent s'ajouter des phénomènes épigénétiques), augmentant d'autant le nombre d'isoformes, et permettant de former des polypeptides de 275 à 539 acides aminés, soit de 30 à 65kDa (Tableau I) (Kinoshita 2003b; Peterson and Petty 2010; Russell and Hall 2011). Une diversité considérable est de cette manière générée. Les septines humaines partagent ainsi 39 à 63% d'identité avec *SEPT2*, et au minimum 26% d'identité avec l'ensemble des septines, au niveau de leur séquence en acides aminés (Kinoshita 2003b).

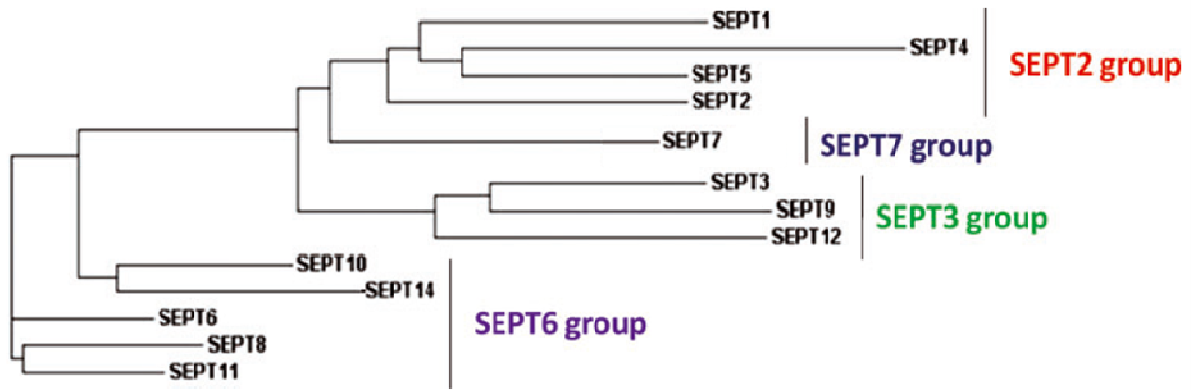
**Tableau I : Transcrits et isoformes des gènes et pseudogènes de septines humaines**

(Modifié d'après Peterson and Petty 2010 et NCBI (RefSeq mise à jour du 18/11/2011))

Septines humaines	Nombre de transcrits connus	Nombre d'isoformes connus	Nombre de pseudogènes	Régions variables	Statut RefSeq NCBI
<i>SEPT1</i>	1	1	-	-	en révision
<i>SEPT2</i>	4	1	-	5'-UTR et 3'-UTR	validé
<i>SEPT3</i>	2	2	-	3'-UTR et C-ter	en révision
<i>SEPT4</i>	6	4	-	5'-UTR et 3'-UTR N- et C-ter	en révision
<i>SEPT5</i>	2	2	-	Epissage	en révision
<i>SEPT6</i>	4	4	-	3'-UTR et C-ter	en révision
<i>SEPT7</i>	3	3	13	Epissage alternatif de l'exon2	en révision
<i>SEPT8</i>	4	4	-	5'-UTR et 3'-UTR N- et C-ter	validé
<i>SEPT9</i>	7	6	-	5'-UTR et 3'-UTR Epissage alternatif des exons en 5'	en révision
<i>SEPT10</i>	2	2	1	Epissage alternatif de l'exon2	en révision
<i>SEPT11</i>	1	1	-	-	validé
<i>SEPT12</i>	2	2	-	Epissage alternatif de l'exon central	en révision
<i>SEPT14</i>	1	1	-	-	validé

De plus, des analyses phylogénétiques ont permis de classer les septines humaines en quatre groupes selon leur homologie de séquence et le nombre de domaines « coiled-coil » qu'ils contiennent : les groupes SEPT2, SEPT3, SEPT6 et SEPT7 (Figure 15) (Kinoshita 2003b; Pan *et al.* 2007; Peterson and Petty 2010). Le groupe SEPT7 est un peu particulier, puisqu'il ne contient qu'un seul membre dans tous les organismes étudiés à ce jour, contrairement aux autres groupes (Nakahira *et al.* 2010). Cependant, certaines études classent SEPT7 au sein du groupe 2 (Hall *et al.* 2005a; Cao *et al.* 2007). Structurellement différente des autres membres de cette famille, SEPT7, qui est un élément fondamental et indispensable à la constitution du filament de septine (Sirajuddin *et al.* 2007), possède un nombre disproportionné de pseudogènes (Russell and Hall 2011). Bien que normalement inactifs et ne pouvant pas traduire de protéine, certains pseudogènes peuvent tout de même être transcrits (Zheng *et al.* 2007), et de ce fait réguler l'expression de certaines familles de gènes par une interaction gène-pseudogène (Piehler *et al.* 2008). SEPT7 et ses orthologues dans d'autres espèces semblent jouer un rôle important dans la biologie des septines, qui reste cependant à éclaircir (Russell and Hall 2011).





**Figure 15 : Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines**

(modifié d'après Peterson and Petty 2010)

### I.2.2. Domaines fonctionnels

#### I.2.2.1. Domaine central très conservé

Malgré cette diversité, toutes les septines ont une structure commune qui lie et hydrolyse le GTP. Des analyses de la similarité de leur séquence en acides aminés ont montré que le domaine central des septines de mammifères est très conservé et contient un domaine polybasique et un autre liant le GTP (Figure 16 A) (Spiliotis and Nelson 2006).

La similarité de séquence est plus élevée au niveau de la région centrale liant le GTP, qui contient des motifs consensus G1 (GxxxxGK[S/T]), G3 (DxxG) et G4 (xKxD) retrouvés chez les petites GTPases (Field and Kellogg 1999). Le motif G1 forme une boucle flexible qui interagit avec le groupement phosphate du GTP. Le motif G3 se lie à l'ion  $Mg^{2+}$  et peut interagir avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du GTP. Le motif G4 semble important pour la spécificité de liaison du GTP (Cao *et al.* 2009). Par analogie avec l'actine et la tubuline, la liaison au nucléotide peut être impliquée dans le contrôle de l'assemblage et de la fonction des septines. Cependant, on ne sait toujours pas comment la liaison et l'hydrolyse du nucléotide sont régulées dans les différents groupes de septines.

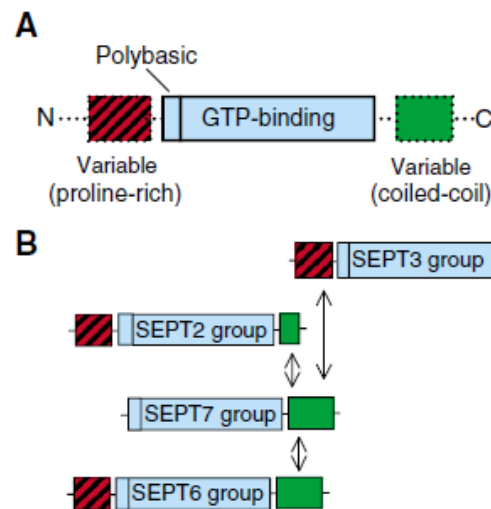
Précédant le domaine GTPase, le domaine polybasique est responsable de l'association des septines avec les phospholipides des membranes cellulaires (Cao *et al.* 2009; Peterson and Petty 2010).

#### I.2.2.2. Domaines N- et C-terminaux variables

Les régions N- et C-terminales varient en longueur et en composition d'acides aminés, et contiennent respectivement des domaines variables riches en proline et/ou des domaines en superhélice  $\alpha$  appelés « coiled-coil » (Figure 16 A). On peut remarquer notamment l'absence de domaine « coiled-coil » C-

terminal pour le groupe SEPT3, tandis que celui du groupe SEPT2 est plus court que celui du groupe SEPT6 (Figure 16 B) (Kartmann and Roth 2001; Kinoshita 2003b; Spiliotis and Nelson 2006).

Ces domaines C-terminaux sont impliqués dans des interactions homotypiques et hétérotypiques, aussi bien entre certaines septines entre elles qu'entre les septines et d'autres protéines (Longtine *et al.* 1996). Il semble que les septines des groupes 2, 6 et 7 s'assemblent par les domaines « coiled-coil » de leur extrémité C-terminale, alors que la SEPT9, appartenant au groupe 3, s'associe avec d'autres septines par l'intermédiaire de son domaine N-terminal (Spiliotis and Nelson 2006).



**Figure 16 : Domaines fonctionnels des septines chez les mammifères**

**A :** Structure générale des septines, **B :** Variabilité de structure des quatre groupes de septines

(Spiliotis and Nelson 2006)

### I.2.3.Modifications post-traductionnelles

Les septines peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination ou la SUMOylation, qui semblent pouvoir réguler la dynamique de polymérisation des complexes de septines (voir I.3.3 Régulation de l'assemblage des Septines).

#### I.2.3.1. Phosphorylation

Des études ont montré que les septines de mammifères possèdent de multiples sites de phosphorylation. Elles peuvent être phosphorylées par des sérine/thréonine kinases telles que la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase I cGMP-dépendante (PKG-I) dans les neurones après la mitose (She *et al.* 2004) ou par la kinase Aurora-B dans les cellules en mitose (Qi *et al.* 2005).

### I.2.3.2. Ubiquitination et SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur une lysine de la protéine. Le processus de sumoylation est très proche biochimiquement de l'ubiquitination, en impliquant une cascade similaire d'enzymes. En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne principalement la dégradation par le protéasome de la protéine ciblée, la sumoylation semble plutôt réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles, notamment en ce qui concerne les septines (Johnson and Blobel 1999).

## I.3. Dynamique de polymérisation des septines

### I.3.1. Assemblage en hétéro-oligomères

Il n'est pas clairement établi que l'unité fonctionnelle des septines de mammifères soit le monomère. Au contraire, des études ont montré que les monomères de septines sont instables *in vivo* et forment des agrégats *in vitro* (Kinoshita *et al.* 2002; Sheffield *et al.* 2003). En effet, les septines s'assemblent en complexes hétéro-oligomériques linéaires, de taille et de composition variable, formant des structures filamenteuses apolaires (Byers and Goetsch 1976; Bertin *et al.* 2008).

Déterminer la composition des complexes de septine a longtemps été un challenge mais la cristallisation récente des sous-unités humaines ubiquitaires de SEPT2 (Sirajuddin *et al.* 2007) et SEPT7 (Zent *et al.* 2011), ont permis des progrès dans la compréhension de la biochimie des septines.

#### I.3.1.1. Domaines G d'interaction des septines avec le GTP

La SEPT2 humaine sans les 46 résidus du domaine « coiled-coil » C-terminal (appelée SEPT2-315) a été exprimée chez *E. coli*, purifiée et co-cristallisée en présence de GDP (Sirajuddin *et al.* 2007).

Son domaine de liaison au GTP, appelé domaine G, a été décrit avec une résolution de 3,4Å et a révélé un repliement de GTPase similaire à celui de la petite GTPase Ras.

La structure de base du monomère de SEPT2 possède six feuillets  $\beta$  et cinq hélices  $\alpha$ . Comparée à Ras, SEPT2 possède quatre éléments supplémentaires qui la caractérisent, deux hélices  $\alpha$  en C-ter et en N-ter flanquant la partie centrale conservée du domaine G, et l'insertion d'une hélice  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles dans la partie centrale de la GTPase. Les séquences en acides aminés de ces éléments supplémentaires sont très conservées, possédant des résidus qui ne varient pas entre SEPT2-SEPT6-SEPT7 et qui sont impliqués dans les contacts entre sous-unités voisines (Sirajuddin *et al.* 2007).

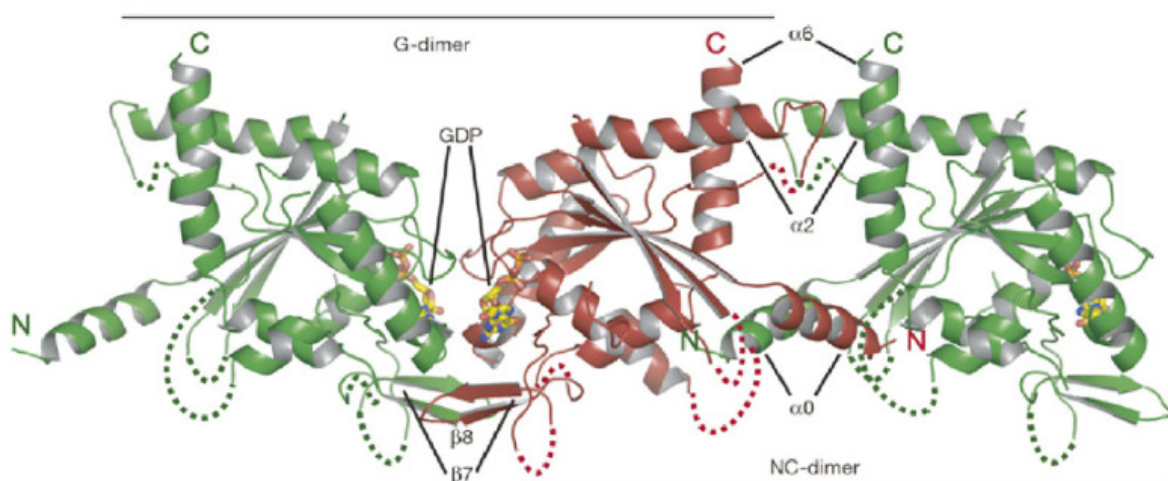
Des cristaux diffractant d'une forme tronquée de SEPT7 contenant 269 résidus, SEPT7(29-297), ont été obtenus sous la forme liée au GDP, avec une résolution de structure de 3,3Å. La structure globale du domaine G d'interaction de SEPT7 est très similaire à celui de SEPT2, avec notamment quelques résidus assez conservés, mais ces deux septines possèdent des propriétés différentes notables. Ceci suggère que certains aspects particuliers des interfaces G et NC sont conservés chez toutes les septines (Zent *et al.* 2011).

### I.3.1.2. Dimères G et NC d'interaction des septines

Au sein du cristal, les domaines G de SEPT2 interagissent pour former des filaments allongés avec deux interfaces différentes d'oligomérisation. Lorsque deux septines consécutives interagissent par leur domaine GTPasique, on parle de dimère G. A l'inverse, lorsque ce sont les hélices N- et C-terminales qui interagissent, à l'opposé du domaine G, on parle de dimère NC (Figure 17). En solution, SEPT2 s'assemble uniquement en dimères G, tout comme SEPT7 (Sirajuddin *et al.* 2007).

En présence de GDP ou de GppNHp, un analogue du GTP lentement hydrolysable, l'équilibre est déplacé en faveur du dimère, alors qu'en présence de phosphatase acide, les monomères sont prédominants. La dimérisation est donc influencée par la présence mais pas par la nature du nucléotide (GDP ou GTP). De même, le domaine « coiled-coil » C-terminal n'intervient pas dans la dimérisation. Il apparaît donc que les dimères G sont les plus stables (Sirajuddin *et al.* 2007).

Par ailleurs, la structure filamenteuse observée du domaine G de SEPT2 suggère que les interactions observées peuvent être répliquées dans un assemblage de septines multimériques.



**Figure 17 : Modèle ruban de l'assemblage de SEPT2-315 en dimères G et NC**

(Sirajuddin *et al.* 2007)

### I.3.1.3. Assemblage et Composition variable des hétéro-oligomères

Bien que les complexes de septines présentent des similarités structurales, le nombre ainsi que le mode d'assemblage de ces différents polypeptides de septine varie selon les organismes.

#### ◆ Chez le nématode et la levure

Le nématode *C. elegans* exprime seulement deux septines (UNC-59 et UNC-61) (Nguyen *et al.* 2000), contre quatre à cinq chez les levures, qui forment de longs filaments organisés par paires comme cela a pu être visualisé en microscopie électronique (Frazier *et al.* 1998).

Une étude a démontré que les protéines UNC-59 et UNC-61 interagissent par l'intermédiaire de l'interface NC, et que deux dimères s'assemblent de façon symétrique par l'intermédiaire de l'interface G, formant ainsi l'assemblage linéaire et non polaire UNC-59–UNC-61–UNC-61–UNC-59 (John *et al.* 2007). De façon intéressante, les domaines « coiled-coil » sont flexibles et se projettent hors du dimère (Figure 18).

Comme pour le tétramère du nématode, le complexe de septines chez la levure *S. cerevisiae* forme un octamère linéaire non polaire et symétrique selon l'ordre Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 (Figure 18). Chaque septine s'associe à une septine voisine par l'intermédiaire de son interface G d'un côté, et par l'intermédiaire de son interface NC de l'autre côté. Les domaines « coiled-coil » de deux Cdc3 et Cdc12 se projettent du même côté de l'octamère et s'apparient pour former des super-hélices parallèles, essentielles à la stabilité de l'octamère (Bertin *et al.* 2008).

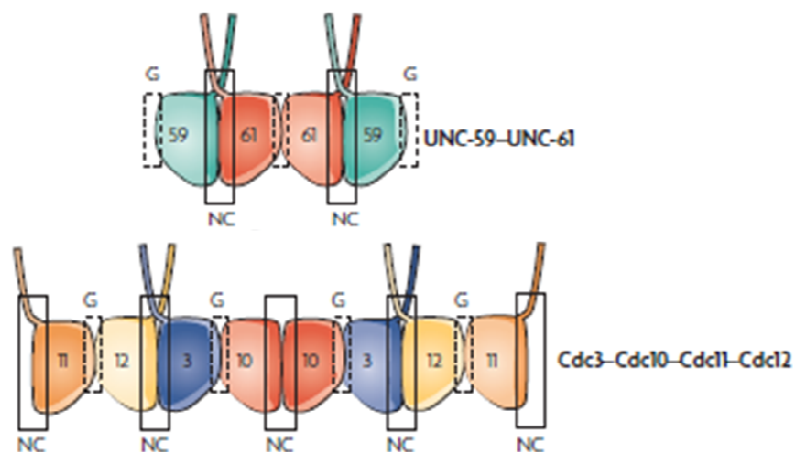


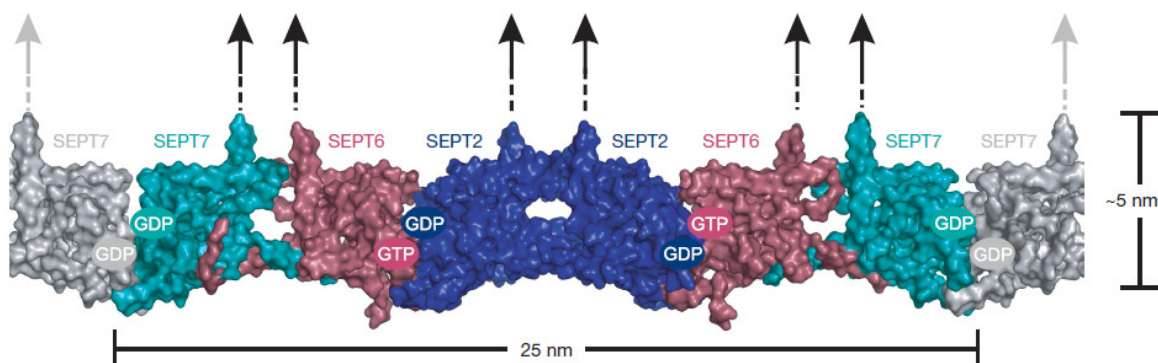
Figure 18 : Composition des complexes de septines chez *C. elegans* et *S. cerevisiae*

Haut : Hétéro-dimère de UNC-59–UNC-61 chez *C. elegans*, Bas : Hétéro-tétramère de Cdc3-Cdc10-Cdc11-Cdc12 chez *S. cerevisiae* (Weirich *et al.* 2008)

### ◆ Chez les mammifères

Des analyses phylogénétiques basées sur les similarités de séquences montrent que certaines septines de mammifères, et notamment les SEPT3, 9 et 12 constituant le groupe SEPT3, sont les équivalents de Cdc10 puisqu'elles sont exemptes de région « coiled-coil » C-terminale. Aussi, les septines du groupe SEPT6 (SEPT6, 8, 10, 11 et 14) sont les équivalents de Cdc3 (Kinoshita 2003b). En revanche, les autres septines animales ne peuvent pas être classées de manière évidente comme des orthologues des septines de levure sur leur seule structure primaire (Macara *et al.* 2002). Cependant, tous les complexes de septines caractérisés à ce jour chez les mammifères contiennent SEPT6 (ou ses paralogues) et SEPT7 (Kinoshita 2003a). Leur association s'effectuant par leur interface NC (Sheffield *et al.* 2003), on peut supposer que le dimère SEPT6-SEPT7 est l'équivalent du dimère Cdc3-Cdc12 chez la levure. De plus, tous les complexes de septines isolés chez les cellules de mammifères contiennent également une ou deux septines additionnelles, provenant du groupe de SEPT2 et/ou du groupe SEPT3 (Versele and Thorner 2005).

Chez les mammifères, les complexes de septines contiennent généralement trois ou quatre différentes septines, chacune étant présente en deux copies par complexe. L'hétéro-trimère palindromique de septines humaines SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 a été co-cristallisé (Figure 19). Le filament du cristal est constitué d'un assemblage de domaines G. Ces derniers interagissent par l'intermédiaire des mêmes interfaces G et NC que celles observées dans le cristal de SEPT2-315. Ainsi, les interactions SEPT7-SEPT6 se font par leurs interfaces NC, et celles de SEPT6-SEPT2 par leurs interfaces G. De même que pour les dimères de SEPT2, les domaines « coiled-coil » sont également orientés perpendiculairement à la direction du polymère. De plus, des nucléotides liés au polymère de septines ont également été observés, avec un ratio GDP:GTP >2:1. SEPT2 et SEPT7 sont toutes les deux liées au GTP, alors que SEPT6 est liée au GDP. La liaison et l'hydrolyse du nucléotide au niveau de certaines sous-unités spécifiques de septines semblent donc avoir des rôles distincts dans la formation et le désassemblage du filament (Sirajuddin *et al.* 2007).



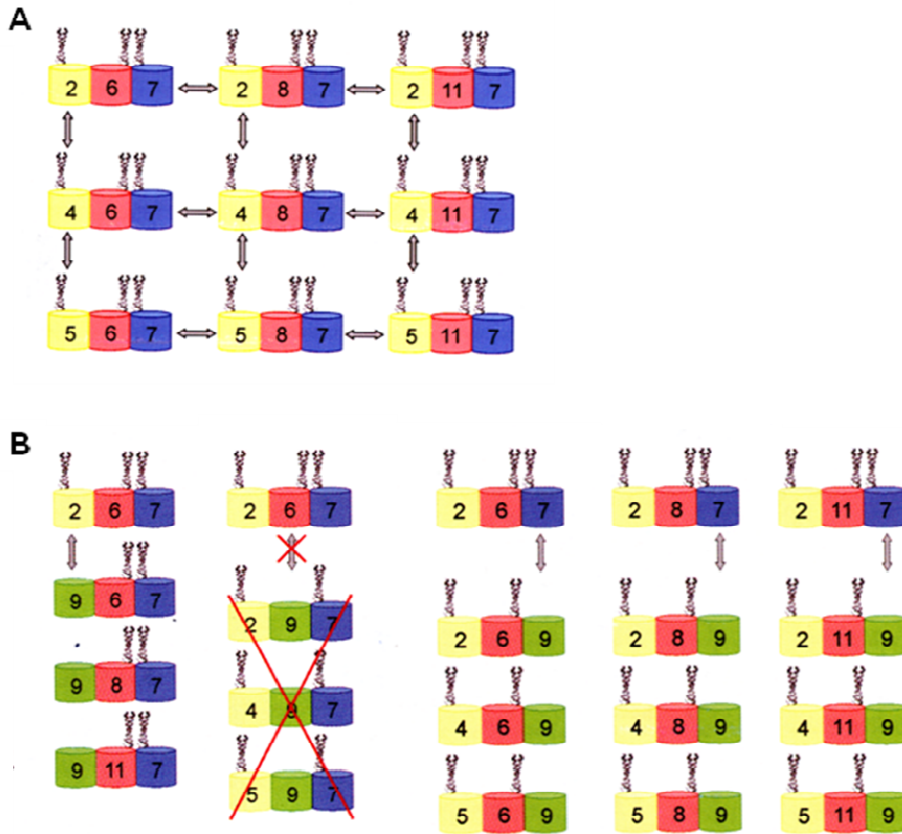
**Figure 19 : Structure d'un hétéro-trimère de septines de mammifères**

(Sirajuddin *et al.* 2007)

Une étude très récente montre que les septines humaines peuvent exister sous forme d'hétéro-trimères ou d'hétéro-tétramères, les monomères et les hétéro-dimères n'étant pas assez stables. Les hétéro-trimères contiennent tous des membres des groupes SEPT2, SEPT6 et SEPT7 et les hétéro-tétramères contiendraient également SEPT9, membre du groupe SEPT3 (Sellin *et al.* 2011).

Par ailleurs, les différentes interactions possibles des septines humaines ont été récemment caractérisées dans une approche de double et triple hybride (Sandrock *et al.* 2011). Cette dernière confirme que les membres du groupe SEPT2 et du groupe SEPT7 interagissent avec les membres du groupe SEPT6, sans interaction directe possible entre SEPT2 et SEPT7 (Figure 20 A). SEPT9 qui ne fait pas partie du trimère SEPT2/6/7, est néanmoins capable de se substituer à SEPT2, mais pas à SEPT6. De plus, l'hypothèse selon laquelle SEPT7 serait unique et non substituable (Kinoshita 2003b) est contredite par les résultats de l'approche triple hybride, montrant que SEPT7 est partiellement échangeable par SEPT9, en particulier si la septine centrale du trimère est SEPT11 (Figure 20 B) (Sandrock *et al.* 2011).

Concernant la formation de tétramères, deux types d'assemblage sont proposés (Figure 21) (Sandrock *et al.* 2011). SEPT9 peut soit s'intercaler entre deux SEPT7 pour former un complexe linéaire, semblable à l'octamère chez la levure (Bertin *et al.* 2008), soit interagir à la fois avec SEPT6 et SEPT7 en s'associant latéralement à un trimère (Versele and Thorner 2005).



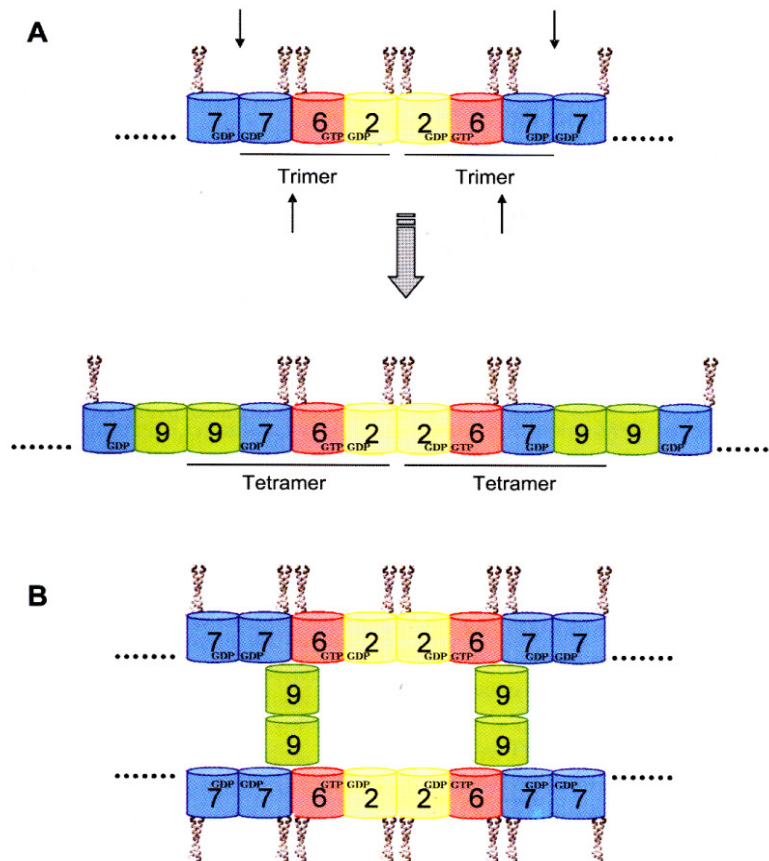
**Figure 20 : Compositions d'hétéro-trimères possibles de septines chez les mammifères**

**A** : combinaisons d'hétéro-trimères possibles avec les septines des groupes SEPT2, SEPT6 et SEPT7,

**B** : combinaisons d'hétéro-trimères possibles ou non par substitution d'une septine par SEPT9

(d'après Sandrock *et al.* 2011)





**Figure 21 : Assemblages possibles des hétéro-tétramères de septines**

**A :** Formation d'un octamère linéaire par insertion de SEPT9 entre deux SEPT7 d'un hétéro-trimère,  
**B :** Formation d'un octamère par association latérale de SEPT9 à SEPT6/SEPT7

(d'après Sandrock *et al.* 2011)

D'autres complexes ont également été purifiés dans différents types cellulaires, comme le complexe SEPT7/SEPT9b/SEPT11 dans des fibroblastes embryonnaires de rat (Nagata *et al.* 2004) et le complexe SEPT3/SEPT5/SEPT7 dans des neurones (Fujishima *et al.* 2007; Lukoyanova *et al.* 2008), eux aussi comportant des septines provenant de trois groupes différents. La redondance et l'interchangeabilité des sous-unités de septines semblent contribuer à la diversité combinatoire des complexes de septines. Cependant, il reste à étudier les propriétés biochimiques et fonctionnelles des diverses compositions possibles.

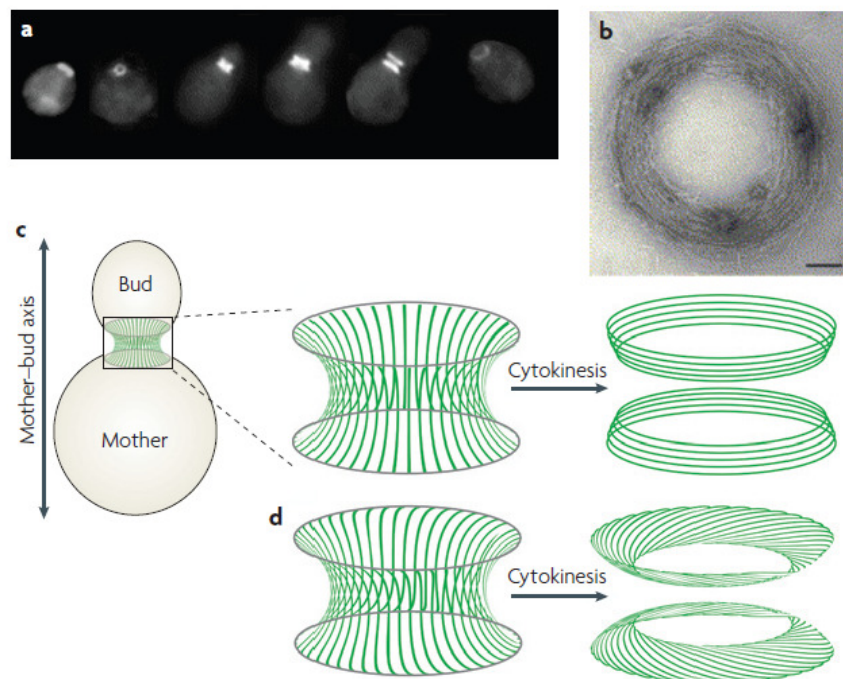
### I.3.2. Assemblage en structures d'ordre supérieur

Les complexes de septines s'assemblent pour former des filaments dans tous les types cellulaires étudiés. *In vivo*, le fonctionnement des septines semble dépendre de l'assemblage des oligomères en structures d'ordre supérieur. Bien que les domaines « coiled-coil » ne soient pas requis pour

l'assemblage de certains complexes de septines, il semble que l'interaction de ces domaines entre septines voisines joue un rôle fondamental dans la stabilisation des complexes mais aussi dans l'assemblage de filaments. Ces interactions permettent également de moduler l'appariement de filaments *in vitro* et *in vivo*. Cependant, l'architecture et les mécanismes d'assemblage de ces structures d'ordre supérieur sont encore méconnus.

### I.3.2.1. Chez la levure, assemblage de filaments en sablier ou en anneau

Chez la levure *S. cerevisiae* en division, les septines sont localisées au niveau de l'anneau contractile. Au cours de la cytokinèse, l'assemblage de filaments de septines est dynamique, et forme un sablier qui se divise ensuite en deux anneaux séparés (Figure 22). Avant la cytokinèse, les filaments semblent alignés le long de l'axe cellule mère-bourgeon. Lors de l'abscission, les filaments subissent une rotation de 90° permettant la formation de deux anneaux distincts (Vrabioiu and Mitchison 2006). L'organisation exacte des filaments au sein de ce sablier, rectilignes ou incurvés, est en revanche controversée (Weirich *et al.* 2008).

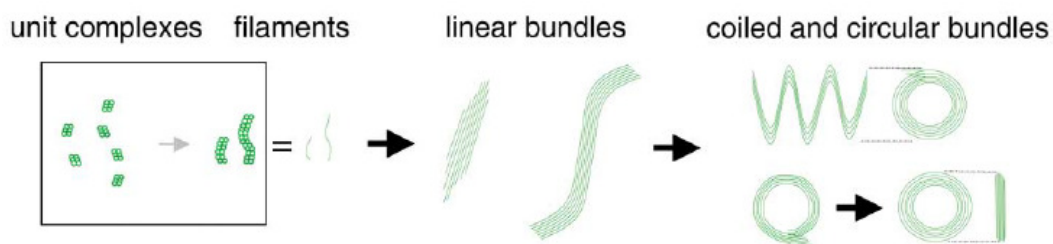


**Figure 22 : Modèle d'assemblage dynamique des septines au niveau de l'anneau contractile chez la levure**

**a** : localisation des septines au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* visualisée en microscopie à fluorescence, **b** : structure en anneau formée par des faisceaux de SEPT2, SEPT6 et SEPT7 *in vitro* (barre = 100nm), **c** : modèle de filaments de septines lors de la cytokinèse, **d** : modèle modifié avec des filaments incurvés (Weirich *et al.* 2008)

### I.3.2.2. Chez les mammifères, assemblage en filaments ou en anneaux

Chez les mammifères, des filaments de septines se forment par assemblage de complexes les uns derrière les autres. Ces filaments peuvent ensuite s'assembler latéralement pour conduire à la formation de faisceaux, ou se courber jusqu'à former des boucles ou des anneaux de  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$  de diamètre (Figure 23) (Kinoshita *et al.* 2002). *In vitro*, l'assemblage de filaments de septines en structures d'ordre supérieur semble être un processus irréversible, et ne semble pas être lié à un échange ou à l'hydrolyse de nucléotides (Kinoshita 2003a). Dans les cellules de mammifères, les filaments et les anneaux contenant SEPT2 sont des structures hautement dynamiques, qui sont capables d'échanger rapidement des molécules de SEPT2 cytoplasmiques avec les polymères (Schmidt and Nichols 2004). Ainsi, les polymères de septines semblent être en équilibre dynamique avec les oligomères non liés, et cet échange dynamique semble sensible aux transitions spécifiques du cycle cellulaire.



**Figure 23 : Assemblage des complexes de septines en structures d'ordre supérieur chez les mammifères**

(Kinoshita *et al.* 2002)

L'importance physiologique *in vitro* des anneaux de septines n'a pas encore été établie. Cependant, ces derniers sont presque identiques aux anneaux de septines qui apparaissent après perturbation du réseau d'actine dans des cellules en culture (Xie *et al.* 1999; Oegema *et al.* 2000; Kinoshita *et al.* 2002). Les anneaux de septines pourraient constituer un mode de stockage ou correspondre à un défaut de l'assemblage des septines en absence d'actine (Kinoshita *et al.* 2002).

Dans des cellules de mammifères en culture, l'assemblage des septines semble avoir lieu en association avec des structures d'actine, telles que des anneaux contractiles, de l'actine corticale et des fibres de stress (Joberty *et al.* 2001; Kinoshita *et al.* 2002). Mais cette interaction n'est pas directe, car leur association nécessite des molécules adaptatrices telles que l'anilline, une protéine de liaison à l'actine (Oegema *et al.* 2000) (voir III.1 Les Septines, un nouvel élément de cytosquelette ?).

Par ailleurs, plusieurs septines, et notamment SEPT9, sont présentes le long des microtubules dans certaines lignées cellulaires (Surka *et al.* 2002; Nagata *et al.* 2003; Silverman-Gavrila and Silverman-Gavrila 2008). La relation entre les septines et les microtubules n'est pas encore bien connue, mais il

semble que leur interaction soit directe, étant donné qu'une SEPT9 recombinante et des microtubules purifiés sont capables de co-sédimer *in vitro* (Nagata *et al.* 2003) (voir III.3 Interaction avec les Microtubules).

### I.3.3.Régulation de l'assemblage des Septines

#### I.3.3.1. Régulation par le GTP/GDP

Pour toutes les GTPases, la liaison et l'hydrolyse du GTP permet à la protéine d'agir comme un « interrupteur » moléculaire, mais son rôle diffère nettement selon les sous-familles de GTPases. La plupart des septines chez les levures et les mammifères sont capables de lier et d'hydrolyser le GTP. Des nucléotides liés aux septines ont été co-cristallisés avec le complexe SEPT2/6/7, SEPT2 et SEPT7 étant liés au GDP, et SEPT6 au GTP. Les taux d'échange et d'hydrolyse des nucléotides par les septines sont lents *in vitro*, et le turnover du GTP dans les complexes de septines *in vivo* est très lent (Frazier *et al.* 1998; Vrabiou *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006). *In vitro*, les polymères de septines de mammifères ont peu ou pas d'activité GTPasique (Kinoshita *et al.* 2002; Sheffield *et al.* 2003).

Pour de nombreuses septines, une mutation au niveau de résidus contribuant à la liaison du GTP peut altérer la formation, l'appariement, la localisation et/ou la fonction des filaments de septines (Kinoshita *et al.* 1997; Casamayor and Snyder 2003; Vega and Hsu 2003; Hanai *et al.* 2004; Robertson *et al.* 2004). En effet, dans le cas du dimère de SEPT2, une mutation au niveau de la thréonine-78 empêche la liaison et l'hydrolyse du GTP. Des données *in vivo* chez la levure ont révélé que les résidus équivalents à la Thr-78 sont nécessaires pour Cdc10 et Cdc12, mais pas pour Cdc3 et Cdc11 (Sirajuddin *et al.* 2009). Étant donné que l'hydrolyse du GTP des complexes oligomériques est lente, d'autres facteurs cellulaires doivent être impliqués dans la régulation de la réaction. L'activité GTPase intrinsèque des septines ne semble donc pas jouer un rôle régulateur dans l'assemblage des hétéro-oligomères au-delà du repliement initial et de la dimérisation des monomères (Mitchison and Field 2002; Sheffield *et al.* 2003).

#### I.3.3.2. Régulation par Cdc42 et Rho

Cdc42p, une petite Rho-GTPase, joue un rôle fondamental dans l'assemblage des septines chez la levure *S.cerevisiae* (Gladfelter *et al.* 2002). Des mutations au niveau de CDC42p causent des défauts de la localisation polarisée de l'actine et des septines au niveau des sites de bourgeonnement (Gladfelter *et al.* 2001).

Dans les cellules de mammifères, Cdc42 semble également jouer un double rôle dans la promotion de l'organisation du cytosquelette d'actine et des complexes de septines (Joberty *et al.* 2001). Cette étude a démontré une liaison directe de complexes de septines (SEPT2/6/7) à un effecteur en aval de Cdc42,

appelé Borg3. La surexpression de Borg3 perturbe l'assemblage des septines en structures fibrillaires, et l'effet est amplifié par l'expression d'un mutant constitutivement actif de Cdc42, qui inhibe l'interaction Borg3-septine.

Rho, un membre d'une autre famille de GTPases, joue un rôle important de régulateur dans divers processus cellulaires tels que le remodelage du cytosquelette d'actine, la cytokinèse et la motilité cellulaire (Etienne-Manneville and Hall 2002). Il a été suggéré que les voies de transduction de signal Rho-dépendante contrôlent non seulement le cytosquelette d'actine, mais aussi la morphologie des filaments de septines (Nagata and Inagaki 2005). Une autre étude a identifié la Rhotekine, une protéine effectrice en aval de Rho, comme une candidate régulatrice organisant les structures de septines par perturbation des filaments (Ito *et al.* 2005).

### I.3.3.3. Régulation par phosphorylation et par sumoylation

Plusieurs études ont montré que les septines de mammifères peuvent être phosphorylées par des kinases telles que la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase I cGMP-dépendante, la kinase Aurora-B et la kinase DYRK1A dans les cellules mitotiques (Xue *et al.* 2000; Xue *et al.* 2004; Qi *et al.* 2005; Sitz *et al.* 2008). SEPT2 sauvage possède un site unique de phosphorylation *in vivo* au niveau de la sérine-248 (She *et al.* 2004). Des études complémentaires devraient permettre de mettre en évidence si la phosphorylation et la déphosphorylation jouent un rôle important dans la régulation spatiale et temporelle de l'assemblage et des fonctions des septines dans diverses situations.

Les septines sont également des cibles majeures de sumoylation. Chez la levure, trois septines au moins sont spécifiquement sumoylées lors de la mitose : Cdc3p, Cdc11p et Shs1p. Cette modification intervient avant l'anaphase, et est éliminée lors de la cytokinèse, probablement jouant un rôle dans le désassemblage de l'anneau de septine (Johnson and Blobel 1999; Takahashi *et al.* 1999). Certaines septines de mammifères possèdent des sites possibles de sumoylation, mais il reste à vérifier si la sumoylation, si elle a lieu, est capable de réguler le désassemblage des complexes.

### I.3.3.4. Régulation par l'anilline et la myosine II

L'anilline est considérée comme la principale protéine adaptatrice de septines au niveau de l'anneau contractile. Chez l'Homme, elle est localisée dans le noyau lors de l'interphase, et au niveau du fuseau mitotique lors de la cytokinèse. La surexpression d'un fragment d'anilline (qui empêche sa liaison à l'actine) interagissant avec les septines est capable à la fois de perturber l'organisation des septines mais aussi de causer la perte des faisceaux d'actine dans la cellule (Kinoshita *et al.* 2002). De plus, une étude a démontré que l'anilline est surexprimée dans diverses tumeurs humaines, et notamment dans le

cancer du sein (Ma *et al.* 2003) pouvant de ce fait potentiellement devenir un nouveau biomarqueur (Hall *et al.* 2005b).

La plupart des cellules de mammifères achèvent leur division cellulaire par la formation d'un sillon de clivage, où la séparation a lieu par l'action contractile de la myosine II (myosine non musculaire) et des filaments d'actine. SEPT2 serait impliquée dans l'organisation des filaments d'actine contractile en se liant directement à la myosine II, qui agirait alors comme une protéine adaptatrice reliant les septines à l'actine (Joo *et al.* 2007).

## **II. IMPLICATION FONCTIONNELLE DES SEPTINES**

### **II.1. Chez la levure**

#### **II.1.1. Rôle dans la division cellulaire**

C'est à travers leur rôle dans la division cellulaire chez la levure que les septines ont été le plus étudiées. Cependant, les exigences de ce processus varient considérablement d'un organisme à un autre. Chez *S. cerevisiae*, les septines jouent un rôle essentiel, en fonctionnant comme des protéines d'échafaudage, permettant l'accrochage de composants tels que ceux impliqués dans la formation de l'anneau contractile d'actomyosine et du septum (Bi *et al.* 1998). Au contraire, la délétion de quatre septines chez la levure en fission *S. pombe* ne cause que des défauts mineurs dans la séparation cellulaire (Berlin *et al.* 2003; Tasto *et al.* 2003).

Les septines sont également impliquées dans l'orientation du fuseau mitotique chez *S. cerevisiae*, mais aussi dans certains points de contrôle du cycle cellulaire (Cao *et al.* 2009).

#### **II.1.2. Rôle dans la compartimentation et les barrières de diffusion**

Les septines jouent également un rôle dans la compartimentation et les barrières de diffusion. En interphase, lors de la croissance isotropique du bourgeon, la perturbation de la structure en sablier des septines au niveau du cou du bourgeon empêche le maintien de certains facteurs d'exocytose et de morphogenèse dans le bourgeon. Il en résulte une diffusion passive de protéines membranaires dans la cellule mère (Barral *et al.* 2000; Dobbelaere and Barral 2004).

## II.2. Chez les animaux

Par opposition aux septines chez la levure, qui polymérisent principalement au niveau cortical et de l'anneau contractile, les septines chez les animaux ne sont pas seulement localisées au niveau de la membrane plasmique, mais aussi dans le cytoplasme, où elles interagissent avec le cytosquelette de microtubules et d'actine.

### II.2.1. Rôle dans l'organisation du cytosquelette et la division cellulaire

Chez la drosophile, une mutation au niveau du gène de la septine *pnut* engendre un phénotype létal avec des cellules multinucléées (Neufeld and Rubin 1994). De plus, Pnut et Sep1, une autre septine de drosophile, colocalisent avec l'anneau contractile de cellules en division (Neufeld and Rubin 1994). Chez le nématode *C. elegans*, des mutations au niveau des gènes d'UNC-59 et UNC-61 provoquent des défauts de division cellulaire postembryonnaire. Des études d'immunofluorescence dans des organismes sauvages ont montré une colocalisation des septines au niveau du sillon de clivage où elles pourraient cibler des vésicules membranaires (Nguyen *et al.* 2000).

Dans les cellules de mammifères, des expériences d'inhibition par microinjection d'anticorps ont suggéré l'implication de Nedd5, renommée par la suite SEPT2, au cours de la division cellulaire (Kinoshita *et al.* 1997). Lors de la cytokinèse, SEPT2 colocalise avec l'actine au niveau du plan de division, mais aussi avec les microtubules au niveau du fuseau mitotique, et une expression altérée de septines conduit à des cellules binucléées (Kinoshita *et al.* 1997; Finger *et al.* 2003; Nagata *et al.* 2003). Une autre étude a également suggéré que les septines de mammifères forment une nouvelle famille de protéines d'échafaudage au niveau de la plaque équatoriale du fuseau mitotique, qui coordonne différentes étapes clés de la mitose (Spiliotis *et al.* 2005). Récemment, il a été montré que SEPT7 pouvait se lier directement à la protéine CENP-E et stabiliser le kinétochore. Dans des cellules dépourvues de SEPT7, la tension aux kinétochores de chromosomes bi-orientés est réduite, activant le point de contrôle du fuseau mitotique (Zhu *et al.* 2008).

### II.2.2. Rôle dans l'organisation des membranes et dans le trafic vésiculaire

Les septines de mammifères s'associent aux membranes biologiques par l'intermédiaire de leur région polybasique très conservée. Ainsi, SEPT4 se lie spécifiquement aux phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate (PIP2) et phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate (PIP3) (Zhang *et al.* 1999; Casamayor and Snyder 2003). Dans les cellules de mammifères, un traitement permettant de séquestrer, de déphosphoryler ou de dégrader PIP2 altère l'apparence et la localisation des filaments de SEPT4 (Zhang *et al.* 1999). La signalisation des lipides membranaires et la régulation par le PIP2 du cytosquelette d'actine pourrait donc influencer indirectement la polymérisation des septines (Zhang *et*



al. 1999). Par ailleurs, les septines semblent se lier aux membranes par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme l'anilline (Zhang *et al.* 1999).

Les septines humaines servent également de barrières de diffusion dans les cellules neuronales. SEPT7, en particulier, est localisée au niveau des protrusions dendritiques, et pourrait être importante dans la régulation de la croissance et la morphologie de ces structures (Tada *et al.* 2007; Xie *et al.* 2007).

Dans les cellules post-mitotiques, les septines apparaissent impliquées dans les voies sécrétoires, guidant les vésicules vers leur point d'exocytose (Kartmann and Roth 2001). SEPT3 et SEPT5 sont fortement exprimées dans les neurones et sont associées aux vésicules synaptiques. En effet, SEPT3 est spécifiquement enrichie dans les synaptosomes et dans les extraits de membranes périphériques, et est impliquée dans le recyclage de vésicules synaptiques (Finger *et al.* 2003; Xue *et al.* 2004). Quant à SEPT5, elle interagit directement avec la syntaxine SNARE, qui est impliquée dans la fusion des vésicules avec les membranes (Beites *et al.* 1999; Beites *et al.* 2005).

Enfin, les septines, et notamment SEPT2 et SEPT11, colocalisent avec des structures sous-membranaires riches en actine lors d'étapes précoces de la phagocytose impliquant des récepteurs de surface FcγR (Huang *et al.* 2008).

### **III. INTERACTION DES SEPTINES AVEC LE CYTOSQUELETTE DANS LES CELLULES ANIMALES**

#### **III.1. Les Septines, un nouvel élément de cytosquelette ?**

Bien qu'associées en filaments *in vitro* avec l'actine et/ou les microtubules dans le cytoplasme, l'hypothèse selon laquelle les septines forment un nouvel élément de cytosquelette est controversée (Field and Kellogg 1999).

Etant donné que les septines possèdent des sites de liaison aux nucléotides et forment des filaments à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'hypothèse d'un nouveau polymère de cytosquelette, similaire à l'actine ou à la tubuline, est attirante. Pour pouvoir être considéré comme tel, les septines doivent former des polymères fonctionnels dans toutes les cellules dans lesquelles elles sont exprimées, et doivent avoir besoin de polymériser pour fonctionner. Or, jusqu'à présent, des structures filamentaires de septines n'ont pas été identifiées dans toutes les cellules animales (Field and Kellogg 1999). En outre, ces structures de septines retrouvées dans des cellules animales en culture semblent interagir à la fois avec l'actine et les microtubules.



## III.2. Interaction avec l'actine

De nombreuses études ont montré la colocalisation des filaments de septines avec l'actine. Il a également été montré que la dépolymérisation de l'actine par des composés spécifiques tels que la cytochalasine provoque le décrochage des filaments linéaires de septines des fibres d'actine, qui s'enroulent ensuite en anneaux uniformes de 0,5 à 0,7 $\mu$ m de diamètre, se déplaçant librement dans le cytoplasme (Kinoshita *et al.* 2002). Lorsque l'agent dépolymérisant est éliminé, les septines se réassocient rapidement en filaments avec l'actine.

Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué, l'interaction entre septines et actine n'est pas directe, et nécessite la présence de protéines adaptatrices telles que l'anilline (Oegema *et al.* 2000; Kinoshita *et al.* 2002) ou la myosine II (Joo *et al.* 2007). Or lors de l'interphase, l'anilline est séquestrée dans le noyau, ce qui implique que d'autres protéines adaptatrices doivent être capables de moduler l'interaction septines-actine (Oegema *et al.* 2000).

## III.3. Interaction avec les Microtubules

### III.3.1. Mise en évidence d'une interaction Septines-Microtubules

La première étude reportant une interaction entre les septines et les microtubules a été réalisée chez la levure *S. cerevisiae*, où la localisation de Cdc11 au niveau des microtubules cytoplasmiques et nucléaires a pu être mise en évidence par immunofluorescence (Ford and Pringle 1991). Une dizaine d'années plus tard, une autre étude a démontré que la capture corticale des microtubules mitotiques et leur raccourcissement nécessitent la septine Cdc12, ainsi que les protéines MARK-like (Microtubule Affinity-Regulated Kinase-like) Hsl1 et Gin4, dont la localisation et l'activité dépendent des septines. Des études sur les levures sporulantes ont également confirmé l'interaction entre les septines et les microtubules. En effet, les septines Cdc10, Cdc11 et Spr28 colocalisent avec les microtubules et co-immunoprécipitent avec l' $\alpha$ -tubuline lors de la méiose et avant la formation de la membrane de la pré-spore (Pablo-Hernando *et al.* 2008).

En ce qui concerne les cellules de mammifères, différentes études ont montré que plusieurs membres de la famille des septines colocalisent avec les microtubules. D'ailleurs, cette localisation dépend souvent de la présence des polymères de tubuline puisqu'elle est perturbée lorsque le réseau de microtubules est dépolymérisé par le nocodazole (Silverman-Gavrila and Silverman-Gavrila 2008) (Tableau II).

**Tableau II : Interaction des septines de mammifères avec le cytosquelette de microtubules**

(d'après Silverman-Gavrila and Silverman-Gavrila 2008)

Isoforme de Septine	Interaction	Type cellulaire	Référence
SEPT1	Localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique lors de la mitose, et du corps intermédiaire dans la télophase	HeLa	(Qi <i>et al.</i> 2005)
SEPT2	Co-immunoprécipitée avec le complexe exocyste et la tubuline, et s'organise le long des microtubules en interphase	PC12	(Vega and Hsu 2003)
	Colocalise partiellement avec le réseau de microtubules	MDCK NRK	(Joberty <i>et al.</i> 2001; Schmidt and Nichols 2004)
	Localisée au niveau du fuseau mitotique	MDCK HeLa	(Spiliotis <i>et al.</i> 2005)
	Colocalise avec les microtubules polyglutamylés	MDCK	(Spiliotis <i>et al.</i> 2008)
SEPT5	Co-purifiée avec les boucles de microtubules de la circonférence et la tubuline	Plaquettes humaines	(Martinez <i>et al.</i> 2006)
SEPT6	Localisée au niveau du fuseau mitotique	MDCK HeLa	(Spiliotis <i>et al.</i> 2005)
	Se lie à MAP4 empêchant ainsi sa liaison aux microtubules et de fait réduisant la stabilité des microtubules	HeLa	(Kremer <i>et al.</i> 2005)
SEPT7	Se lie à MAP4 empêchant ainsi sa liaison aux microtubules et de fait réduisant la stabilité des microtubules	HeLa	(Kremer <i>et al.</i> 2005)
SEPT9	Associée aux microtubules interphasiques. Localisée au niveau du fuseau mitotique lors de la mitose et au niveau des microtubules à l'interzone	HMEC Cos7	(Nagata <i>et al.</i> 2003)
	Colocalise avec les microtubules lors de l'interphase et avec le fuseau lors de la mitose : localisation dépendante des microtubules	HeLa	(Surka <i>et al.</i> 2002)
SEPT11	Colocalise avec les microtubules : localisation dépendante des microtubules	HMEC HeLa	(Hanai <i>et al.</i> 2004)

Des études protéomiques réalisées chez les insectes et les mammifères ont également mis en évidence l'association de six différentes septines (SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7, SEPT9 et SEPT11) avec le cytosquelette de microtubules (Sakamoto *et al.* 2008). Par ailleurs, la colocalisation des septines avec les microtubules a également été largement documentée dans les cellules de mammifères grâce à la microscopie à fluorescence (Joberty *et al.* 2001; Surka *et al.* 2002; Nagata *et al.* 2003; Vega and Hsu 2003; Hanai *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2006; Xie *et al.* 2007; Spiliotis *et al.* 2008).

### III.3.2. Analyse structurale de l'interaction septines-Microtubules

Au niveau structural, le mécanisme par lequel les septines s'associent aux microtubules est encore méconnu. Une étude par troncation a permis de mettre en évidence que le domaine GTPase de SEPT9\_v3 est suffisant pour permettre son interaction avec les microtubules (Nagata *et al.* 2003). Néanmoins, il reste à déterminer de quelle manière les dimères d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline établissent le contact avec les septines. La colocalisation de SEPT2 avec les microtubules polyglutamylés suggère que les extrémités fortement chargées (acides) de la tubuline, qui dépassent de la surface du microtubule, pourraient être impliquées (Spiliotis *et al.* 2008).

Au-delà du lien structural entre septines et microtubules, il reste à déterminer si les hétéro-oligomères de septines utilisent les microtubules comme une matrice pour former des filaments les enveloppant, ou s'ils s'étendent longitudinalement à la surface du microtubule (Spiliotis 2010). Quel que soit leur lien, les filaments de septines qui colocalisent avec les microtubules se désassemblent lors de la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole (Surka *et al.* 2002; Nagata *et al.* 2003; Martinez *et al.* 2006). La formation des filaments au niveau du cytosquelette de microtubules dépend donc de la masse de polymère de tubuline, mais peu de choses sont encore connues en ce qui concerne leur dynamique, excepté qu'elle est différente de celle des microtubules. En effet, les filaments de septines sont au moins trois fois moins dynamiques que les microtubules (Hu *et al.* 2008) suggérant que ces oligomères de septines filamentaires pourraient persister alors que les microtubules dynamiques subissent des phases de dépolymérisation et de sauvetage.

### III.3.3. Régulation de l'organisation et des fonctions des microtubules par les septines

Bien que les propriétés de liaison des septines aux microtubules soient encore peu connues, de plus en plus d'études montrent l'implication des septines dans l'organisation des microtubules et la motilité microtubule-dépendante. Il semble en effet que les septines régulent les interactions des microtubules avec les MAPs et les moteurs moléculaires grâce à leurs fonctions de barrière de diffusion et de protéines d'échafaudage.

### III.3.3.1. Régulation de l'organisation des microtubules

Contrairement à la plupart des MAPs, qui s'associent largement avec les microtubules, les septines de mammifères, lorsque présentes sur le cytosquelette de microtubules, n'en décorent qu'une fraction (Spiliotis 2010).

Une colocalisation partielle des septines avec les microtubules a été reportée pour les septines ubiquitaires SEPT2, SEPT6, SEPT7 et SEPT9 dans une variété de lignées cellulaires, notamment dans les cellules HeLa, HMEC et MDCK (Joberty *et al.* 2001; Surka *et al.* 2002; Nagata *et al.* 2003; Spiliotis *et al.* 2008). L'importance de la colocalisation avec les microtubules varie selon les isoformes de septines, les lignées cellulaires et les phases du cycle cellulaire. De plus, leur association est souvent spatialement restreinte à des régions subcellulaires particulières, telles que l'environnement de l'enveloppe nucléaire et la périphérie cellulaire. Il a été récemment montré que les filaments de SEPT2 sont particulièrement enrichis au niveau des membranes golgiennes, où SEPT2 se retrouve localisée au niveau de microtubules polyglutamylés (Spiliotis *et al.* 2008).

Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour établir le rôle des septines dans la formation de sous-ensembles de microtubules qualitativement et fonctionnellement distincts, la délétion et la surexpression des septines affectent l'organisation et la dynamique microtubulaire, ainsi que leurs modifications post-traductionnelles.

### III.3.3.2. Régulation de la dynamique des microtubules

Dans les cellules HeLa, l'inhibition de SEPT7 provoque une augmentation de la résistance à la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole, mais aussi une augmentation du niveau d'acétylation de la tubuline (Kremer *et al.* 2005). D'autre part, la déplétion de SEPT9\_v3 diminue le niveau de tubuline polymérisée sans altérer les niveaux d'expression des tubulines (Nagata *et al.* 2003). Cependant, les effets de SEPT9 sur la dynamique microtubulaire n'ont pas encore été examinés. Dans les cellules MDCK, l'inhibition de SEPT2 par siRNA engendre la perte de la polyglutamylation des microtubules sans que les effets de cette déplétion sur la dynamique microtubulaire n'aient là encore été analysés (Spiliotis *et al.* 2008). Ceci suggère cependant un rôle important de la liaison de SEPT2 aux microtubules dans la polyglutamylation de ces derniers.

La modulation de la dynamique des microtubules par les septines a été reliée à l'interaction des complexes cytoplasmiques SEPT2/6/7 avec la protéine stabilisatrice MAP4. En effet, l'hétéro-trimère SEPT2/6/7 inhibe *in vitro* la liaison d'une MAP4 recombinante à de la tubuline de cerveau purifiée (Kremer *et al.* 2005). Cette compétition entre MAP4 et le complexe SEPT2/6/7 pour se lier au microtubule a également été retrouvée *in vivo*, dans cette même étude (Kremer *et al.* 2005) ainsi que dans une étude ultérieure sur l'importance du transport vésiculaire dans la polarité cellulaire (Spiliotis

*et al.* 2008). En se liant à MAP4 et en la séquestrant, les complexes de septines pourraient donc réguler la dynamique microtubulaire, en empêchant leur stabilisation des microtubules.

De ce fait, les septines associées aux microtubules doivent également être capables de moduler l'association de la tubuline avec d'autres protéines telles des enzymes responsables de modifications post-traductionnelles (comme les Tubuline-Tyrosine Ligases-Like), d'autres MAPs ou des moteurs moléculaires, dont l'affinité et la directionnalité de liaison sont spatialement régulées par les MAPs et les modifications post-traductionnelles de la tubuline. Fonctionnellement, les septines devraient alors réguler la motilité de certaines protéines ou organites dépendants de la présence des microtubules (Spiliotis 2010).

### III.3.3.3. Régulation du transport intracellulaire dépendant des moteurs moléculaires

SEPT2 est impliquée dans l'alignement correct et la ségrégation des chromosomes au sein du plateau métaphasique de cellules en mitose (Spiliotis *et al.* 2005). En effet, cette protéine est nécessaire à la localisation correcte au niveau du kinétochore de la kinésine-7, un moteur moléculaire mitotique orienté vers l'extrémité (+) du microtubule (également appelé CENP-E pour Centromere-associated Protein E), qui dirige le mouvement de chromosomes mono-orientés vers le plan équatorial de la cellule. Bien que le mécanisme exact ne soit pas connu, des données récentes montrent que les complexes SEPT2/6/7 s'associent avec CENP-E par une interaction directe entre le domaine C-terminal de SEPT7 et l'extrémité C-terminale de CENP-E (Zhu *et al.* 2008).

Aucune étude n'a à ce jour rapporté d'interaction directe entre les septines et les moteurs moléculaires dans les cellules en interphase ou post-mitotiques. Cependant, plusieurs études récentes suggèrent que les septines régulent le transport moteur-dépendant de vésicules membranaires et d'organites. Dans les cellules épithéliales polarisées, l'inhibition de SEPT2 par siRNA ou la microinjection d'anticorps dirigés contre SEPT2 empêchent le transport de vésicules provenant du Golgi vers la membrane plasmique (Spiliotis *et al.* 2008). Il est à noter que ce transport vésiculaire est facilité sur la sous-population de microtubules polyglutamylés (Spiliotis *et al.* 2008).

Par ailleurs, SEPT5 s'associe avec le réseau de microtubules à la circonférence des plaquettes, et contribue à la sécrétion plaquettaire et au transport de granules le long des microtubules (Martinez *et al.* 2006). Dans des cellules spermatiques de souris knock-out pour SEPT4, la localisation des kinésines est significativement perturbée dans les axonèmes des flagelles (Ihara *et al.* 2005). De plus, l'association des septines avec la tubuline neuronale a été décrite, notamment pour SEPT2 (Vega and Hsu 2003), mais son implication dans le transport axonal reste inconnu.

Autrement, les septines peuvent également interagir directement avec les moteurs. Dans une étude protéomique visant à identifier les protéines associées aux moteurs moléculaires, plusieurs septines, à savoir SEPT2, SEPT6, SEPT7, SEPT9 et SEPT11, ont été isolées de microtubules de cellules HeLa

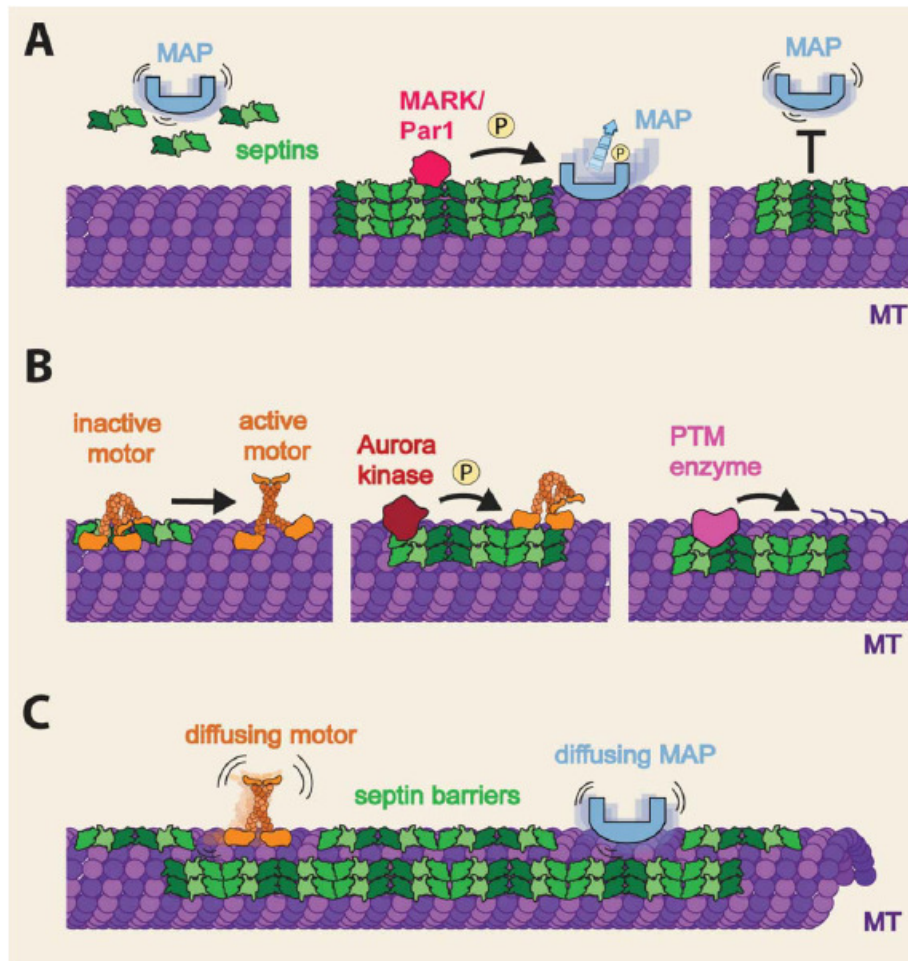
après traitement avec un analogue non hydrolysable de l'ATP, et extraction des moteurs et protéines associées par de l'ATP (Spiliotis 2010).

#### III.3.3.4. Régulation de la motilité des microtubules

La régulation par les septines des interactions entre les microtubules et les MAPs et les moteurs moléculaires est susceptible d'influer sur l'interaction entre les microtubules entre eux, mais aussi sur les membranes cellulaires et le cytosquelette d'actine. De plus, les septines pourraient jouer un rôle critique dans la coordination spatiale de la motilité cellulaire, qui implique le ciblage des microtubules aux adhésions focales, l'orientation des microtubules nucléés au Golgi vers la périphérie cellulaire, et les communications microtubule-actine (Rodriguez *et al.* 2003; Small and Kaverina 2003; Vinogradova *et al.* 2009).

Une étude très récente a montré que les septines guident le mouvement des extrémités plus des microtubules en supprimant les phases de catastrophe des microtubules. En permettant une croissance continue des microtubules, deux populations de septines distinctes de filaments périnucléaires et périphériques orientent la croissance et capturent les extrémités plus des microtubules. Ces données suggèrent que les septines fournissent les signaux de guidage directionnel nécessaires à la polarisation du réseau microtubulaire épithélial (Bowen *et al.* 2011).

Dans tous les cas, il est bien trop tôt pour établir des modèles de régulation de l'organisation des microtubules et de la motilité microtubule-dépendante par les septines. Cependant, il est probable que les septines exercent une régulation spatiale au sein du cytosquelette microtubulaire. Puisqu'elles possèdent une structure oligomérique ayant un turnover plus lent que la tubuline polymérisée, les septines pourraient stabiliser des interactions moléculaires transitoires en agissant comme une matrice à la surface du microtubule. Ainsi, les septines pourraient servir d'échafaudage à l'interaction de MAPs et de moteurs avec leurs kinases et phosphatases respectives et/ou avec les dimères d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline (Figure 24 A et B). Autrement, les septines pourraient restreindre la diffusion unidirectionnelle de moteurs et de MAPs le long du microtubule en limitant leur interaction électrostatique avec la tubuline polymérisée (Figure 24 C) (Spiliotis 2010).



**Figure 24 : Schéma hypothétique de régulation spatiale par les septines des interactions entre les microtubules et les MAPs et les moteurs**

**A :** Régulation par séquestration des MAPs par un complexe de septines cytoplasmique et/ou l'exclusion compétitive de MAPs par les septines sur le microtubule (Kremer *et al.* 2005; Spiliotis *et al.* 2008), ou encore par l'échafaudage par les septines des kinases MARK/Par1, qui interagissent avec les MAPs et qui déclenchent la dissociation des microtubules des MAPs phosphorylées (Drewes *et al.* 1998), **B :** Régulation des interactions microtubules-moteurs soit allostériquement, par liaison directe des septines aux moteurs, soit par le recrutement de kinases médié par les septines, régulant l'activité motrice (Qi *et al.* 2005; Zhu *et al.* 2008), soit encore par l'échafaudage par les septines de l'interaction entre les microtubules et les enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline comme la polyglutamylation, qui sont des régulateurs connus de la liaison des MAPs et des moteurs (Westermann and Weber 2003; Spiliotis *et al.* 2008), **C :** Restriction spatiale par les septines des interactions électrostatiques entre les microtubules et les moteurs et les MAPs, limitant la diffusion unidirectionnelle de protéines le long du microtubule (Cooper and Wordeman 2009) (Spiliotis 2010)



#### IV. SEPTINES ET PHYSIOPATHOLOGIE

Etant donné leur implication dans de nombreux processus cellulaires, il n'est pas surprenant que la famille des septines soit impliquée dans diverses pathologies humaines, comme notamment certains troubles neurologiques, certains cancers ou récemment certaines infections bactériennes (Tableau III) (pour revue : Connolly *et al.* 2011a).

**Tableau III : Caractéristiques des septines humaines et pathologies associées**

(d'après Hall *et al.* 2005a; Peterson and Petty 2010)

Isoforme de Septine	Localisation chromosomique chez l'Homme	Expression	Pathologies associées
SEPT1	16p11.1	cerveau, lymphocytes, autres	Maladie d'Alzheimer, leucémie, lymphome
SEPT2	2q37	ubiquitaire	Cancers du cerveau, du foie et du rein, syndrome de Von Hippel-Landau, maladie d'Alzheimer, infections par Shigella et Listeria
SEPT3	22q13.2	spécifique du cerveau	Cancer du cerveau, maladie d'Alzheimer
SEPT4	17q22	cerveau, testicules, œil, lymphocytes	Maladie d'Alzheimer, cancers de la peau, urogénital et du colon, leucémie, infertilité masculine (défauts de spermatogenèse)
SEPT5	22q11.21	cerveau, œil, plaquettes	Leucémie, maladie de Parkinson, schizophrénie, cancer pancréatique
SEPT6	Xq24	ubiquitaire	Schizophrénie, leucémie, hépatite C
SEPT7	7q36.1	ubiquitaire	Cancers du système nerveux, infertilité masculine (défauts de spermatogenèse)
SEPT8	5q31	cerveau, rétine, autres	Dégénérescence rétinienne
SEPT9	17q25	ubiquitaire	Amyotrophie neuralgique héréditaire, leucémie, cancers du sein, de l'ovaire et colorectal, cancers de la tête et du cou, lymphome d'Hodgkin, infections par Shigella et Listeria
SEPT10	2q13	ubiquitaire	-
SEPT11	4q21.1	ubiquitaire	Schizophrénie, troubles bipolaires, leucémie, infections par Shigella et Listeria
SEPT12	16p13.3	lymphocytes, testicules	Infertilité masculine (défauts de spermatogenèse)
SEPT14	7q11	testicules	-



## IV.1. Septines et maladies infectieuses

Le processus par lequel les pathogènes intracellulaires entrent et se déplacent dans les cellules dépend d'interactions avec le cytosquelette (Cossart *et al.* 2003; Gruenheid and Finlay 2003; Sibley 2004; Smith and Helenius 2004). Il a été démontré que SEPT9 est un composant de la machinerie impliquée dans le mouvement de la bactérie *Listeria monocytogenes* autour des cellules HeLa (Pizarro-Cerda *et al.* 2002; Cossart *et al.* 2003) (Tableau III). Il est possible que d'autres pathogènes, incluant les virus (Smith and Helenius 2004) et les bactéries telles que *Shigella* (Tran Van Nhieu *et al.* 1999) et *Rickettsia* (Frischknecht and Way 2001) puissent utiliser des processus dépendant des septines (Hall and Russell 2004).

Une récente étude a rapporté que des « colliers » de septines, similaires à ceux décrits au niveau de l'anneau contractile de la levure, sont formés aux sites d'entrée de bactéries dans des cellules de mammifères non phagocytaires (Mostowy *et al.* 2009). Il a été démontré par la suite que la cellule hôte met alors en place un mécanisme de protection dans lequel les bactéries intracytosoliques sont piégées dans des structures de septines en forme de cage, dirigées ensuite vers l'autophagie (Mostowy *et al.* 2010).

## IV.2. Septines et troubles neurologiques

Des implications possibles des septines dans les troubles neurologiques ont émergé sur la base de l'expression spécifique dans le cerveau de certaines septines (Tableau III).

SEPT2, SEPT1 et SEPT4 se retrouvent associées à une dégénérescence neurofibrillaire spécifique de la maladie d'Alzheimer (Kinoshita *et al.* 1998). L'interaction entre SEPT5/CDCREL-1 (cell division control-related protein) et la parkine, une protéine pathogénique dans la maladie de Parkinson, met en évidence l'implication d'un autre sous-ensemble de septines dans le développement neuronal et pathologique. SEPT4 a également été impliquée dans la pathogenèse du cerveau par son association avec les inclusions cytoplasmiques dans la maladie de Parkinson et d'autres synucléinopathies (Ihara *et al.* 2003). Le complexe SEPT3/5/7 a été identifié dans le cerveau de mammifères, et SEPT3 est spécifiquement régulée et enrichie dans les terminaisons nerveuses présynaptiques, suggérant un rôle pour ces septines en biologie neuronale (Xue *et al.* 2004; Fujishima *et al.* 2007).

Récemment, des mutations ponctuelles de *SEPT9* et une duplication au sein du gène ont été identifiées chez des patients souffrant d'amyotrophie neuralgique héréditaire, une neuropathie autosomale dominante (Kuhlenbaumer *et al.* 2005; Hannibal *et al.* 2009). Le mécanisme par lequel ces mutations sont pathogéniques dans cette amyotrophie n'est pas encore totalement élucidé, mais il a été démontré que les isoformes v4 et v4\* possèdent des extrémités 5' distinctes encodées par des exons où sont retrouvées les mutations germinales de la neuropathie (McDade *et al.* 2007).

### IV.3. Septines et cancer

#### IV.3.1. Première implication des septines comme partenaires de fusion de MLL

La première évidence d'une contribution des septines dans la néoplasie vient de la découverte de la septine SEPT5/CDCREL-1 comme partenaire de fusion C-terminal de MLL (mixed lineage leukemia) chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue ayant une translocation t(11;22)(q23;q11.2) (Mogensen *et al.* 1998). Par la suite, les septines SEPT9, SEPT6, SEPT2 et SEPT11 ont également été identifiées comme partenaires de fusion avec MLL dans des cellules leucémiques humaines (Osaka *et al.* 1999; Borkhardt *et al.* 2001; Kojima *et al.* 2004; Cerveira *et al.* 2006). MLL est un partenaire de translocation commun dans les leucémies avec plus de 80 réarrangements et 50 partenaires de fusion identifiés (Meyer *et al.* 2006). Ces partenaires de fusion avec MLL semblent contribuer à la pathogenèse de la leucémie (Ernst *et al.* 2002).

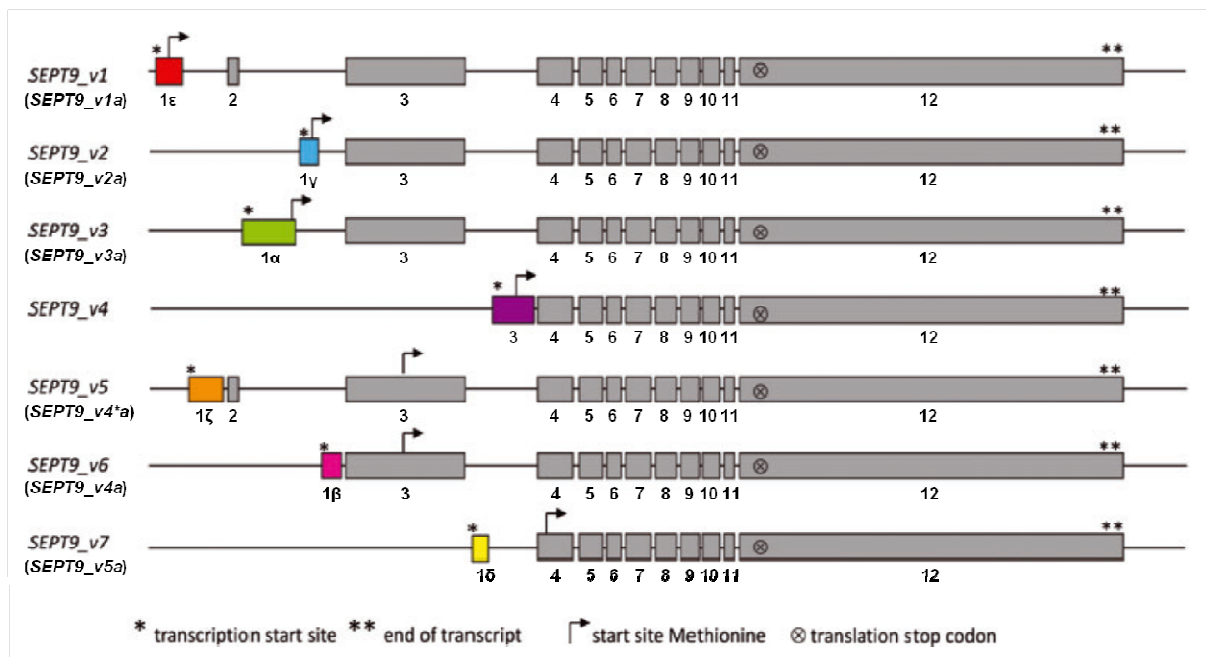
#### IV.3.2. Implication de SEPT9

##### IV.3.2.1. Locus de SEPT9

SEPT9, dont l'implication a été démontrée à la fois dans le cancer et les troubles neurologiques, illustre très bien la diversité de locus des septines humaines. L'intérêt grandissant pour SEPT9 a commencé après qu'elle ait été mise en évidence comme partenaire de translocation de MLL dans la leucémie (Osaka *et al.* 1999). Le gène *SEPT9* a ensuite été cartographié sur le chromosome 17q25, une région reliée aux cancers mammaires et ovariens (Kalikin *et al.* 1996; Kalikin *et al.* 1997; Kalikin *et al.* 2000; Russell *et al.* 2000), suggérant le rôle important que pourrait jouer cette septine non seulement dans les leucémies mais aussi dans les cancers du sein et de l'ovaire.

Par la suite, il a été montré que le locus de *SEPT9* donnait lieu à de multiples transcrits alternatifs codant au moins six isoformes, annotés SEPT9\_v1 à SEPT9\_v5 (Macara *et al.* 2002) selon la nomenclature officielle. Le locus de *SEPT9* contient 13 exons et montre une grande variabilité aux extrémités 5' et 3' aussi bien par épissage alternatif des exons que par différents sites de début de transcription (Figure 25). Les exons variables 1-3 et 12-13 codent des séquences traductionnelles alternatives de début et de fin, et sont épissés sur une base de huit exons codants (Kalikin *et al.* 2000). Ces isoformes maintiennent la structure générale des septines, avec une région centrale très conservée contenant le domaine polybasique et le domaine de liaison au GTP. Elles varient en 5' et 3'-UTR, et en N-ter et C-ter de la protéine. De manière intéressante, les transcrits *SEPT9\_v4\** et *SEPT9\_v4* (dénommées *SEPT9\_v5* et *SEPT9\_v6* respectivement avec la nomenclature officielle) codent exactement la même protéine, mais diffèrent par leur extrémité 5'-UTR, suggérant que ces transcrits sont probablement différenciellement régulés dans le temps ou le tissu dans lequel ils s'expriment (Burrows *et al.* 2003; Scott *et al.* 2005; Scott *et al.* 2006). *SEPT9\_v1* et *SEPT9\_v3*, les transcrits les

plus longs, sont hautement similaires, excepté pour 25 acides aminés distincts à l'extrémité N-terminale de *SEPT9\_v1*. La raison biologique de la présence de multiples isoformes de *SEPT9* n'est pas encore élucidée, mais beaucoup d'études, et notamment des analyses d'expression, montrent que ces isoformes sont différentiellement exprimées et peuvent avoir des spécialisations fonctionnelles distinctes dans les cellules de mammifères.



**Figure 25 : Structure génomique des transcrits et variants de *SEPT9***

Les exons colorés en gris sont les exons communs, et les exons de couleur indiquent les exons spécifiques des différents variants. Les sites de début de transcription sont indiqués par (\*) et la fin de chaque transcrit par (\*\*). Les exons variables encodent différentes séquences de début (flèche) et de fin (⊗) de traduction, et sont épissés au centre au niveau d'exons codants communs partagés par les différents variants.

(modifié d'après Scott *et al.* 2005; Peterson and Petty 2010)

*SEPT9* est largement exprimée si on se base sur l'expression des transcrits adultes et fœtaux ubiquitaires, bien que des isoformes individuelles pourraient avoir une expression tissu-spécifique (Kalikin *et al.* 2000). La localisation cellulaire des isoformes de *SEPT9* est largement cytoplasmique dans les cellules interphasiques, mais l'isoforme *SEPT9\_v1* possède une localisation nucléaire bipartite qui pourrait diriger la navette de *SEPT9\_v1* entre le noyau et le cytoplasme. Dans les cellules en mitose, *SEPT9* montre un marquage ponctiforme entre les chromosomes en séparation, et au niveau du sillon de clivage lors de la télophase (Surka *et al.* 2002). *SEPT9\_v1* se retrouve localisée au niveau du réseau de microtubules dans les cellules en interphase, et au niveau du fuseau mitotique et des faisceaux de microtubules dans le corps intermédiaire dans des cellules en mitose (Nagata *et al.* 2003). Ces deux études montrent que des cellules déplétées en *SEPT9* deviennent binucléées, suggérant un rôle pour cette septine dans la division cellulaire via l'interaction entre les composants du

cytosquelette comme les tubulines. Dans les cellules de mammifères, plusieurs septines, et notamment SEPT2, SEPT5 et SEPT7, ont également été impliquées dans la mitose, spécifiquement dans la dynamique de la ségrégation chromosomique et la cytokinèse. Les isoformes de SEPT9 ne font donc pas exception.

#### IV.3.2.2. Nomenclature complexe de SEPT9

La nomenclature des septines humaines a évolué ces dernières années, comme le montre le Tableau IV ci-dessous. SEPT9 était originellement dénommée MSF (pour MLL septin-like fusion) puisque identifiée comme partenaire de fusion de MLL dans la leucémie (Osaka *et al.* 1999). En 2002, un comité de chercheurs a développé un système de nomenclature officiel pour les transcrits de *SEPT9* (Macara *et al.* 2002). Malgré cela, certaines publications utilisent l'ancienne nomenclature, alors que d'autres utilisent leurs propres versions, rendant la littérature des septines difficile à concilier.

Une nouvelle nomenclature a été établie par le NCBI (National Center for Biotechnology Information) et HUGO (Human Genome Organisation) Gene Nomenclature Committee (HGNC), mais elle doit maintenant être acceptée universellement par la communauté des septines. Pour le moment, la nomenclature encore utilisée est celle de 2005 (Scott *et al.* 2005).

**Tableau IV : Nomenclature de SEPT9**

(modifié d'après Peterson and Petty 2010 et NCBI)

(Kalikin <i>et al.</i> 2000)	(McIlhatton <i>et al.</i> 2001)	(Macara <i>et al.</i> 2002)	(Nagata <i>et al.</i> 2004)	(Scott <i>et al.</i> 2005)	(Estey <i>et al.</i> 2010)	NCBI		NCBI Accession number
						Variant	Isoforme	
MSF-A	Epsilon	SEPT9_v1	SEPT9a	<i>SEPT9_v1a</i>	SEPT9_i1	<i>SEPT9_v1</i>	SEPT9a	NM_001113491.1 NP_001106963.1
-	Gamma	-	-	<i>SEPT9_v2a</i>	SEPT9_i2	<i>SEPT9_v2</i>	SEPT9b	NM_001113493.1 NP_001106965.1
MSF	Alpha	SEPT9	SEPT9b	<i>SEPT9_v3a</i>	SEPT9_i3	<i>SEPT9_v3</i>	SEPT9c	NM_006640.4 NP_006631.2
-	-	-	-	-	-	<i>SEPT9_v4</i>	SEPT9d	NM_001113495.1 NP_001106967.1
MSF-B ?	Zeta ?	-	SEPT9c	<i>SEPT9_v4*a</i>	SEPT9_i4	<i>SEPT9_v5</i>	SEPT9e	NM_001113492.1 NP_001106964.1
MSF-C ?	Beta ?	-	SEPT9c	<i>SEPT9_v4a</i>	SEPT9_i4	<i>SEPT9_v6</i>	SEPT9e	NM_001113494.1 NP_001106966.1
-	Delta	-	-	<i>SEPT9_v5a</i>	SEPT9_i5	<i>SEPT9_v7</i>	SEPT9f	NM_001113496.1 NP_001106968.1

#### IV.3.2.3. SEPT9 comme partenaire de translocation de MLL dans la leucémie

A l'origine, SEPT9/MSF a été identifiée comme partenaire de fusion avec le gène MLL chez un patient atteint de leucémie myéloïde aigue avec translocation t(11;17)(q23;q25) (Osaka *et al.* 1999). Il a été suggéré que MLL était la seule cause clinique de leucémies avec des réarrangements 11q23, puisqu'il est fusionné avec une grande variété d'autres gènes. Cependant, tous les produits de fusion de MLL bien caractérisés produisent des protéines chimériques associées à une variabilité de phénotypes malades de type leucémie, ce qui prouve que les protéines issues de la translocation de chromosomes réciproquement variables contribuent à la pathogenèse de la leucémie (Corral *et al.* 1996; Ernst *et al.* 2002; Meyer *et al.* 2006). Ainsi, les spéculations sur les contributions de l'expression de la protéine de fusion MLL-SEPT9 à une transformation de cellules hématopoïétiques pourraient inclure une potentielle délocalisation de SEPT9 du cytoplasme vers le noyau, une expression aberrante des protéines cibles de MLL, et une activation altérée des voies de signalisation de GTPases. Ceci suggère que ces carboxy-partenaires de fusion, en plus de MLL, sont des contributeurs essentiels pour la pathogenèse de la leucémie (Ernst *et al.* 2002), et implique la famille des septines dans l'oncogenèse (Corral *et al.* 1996).

#### IV.3.2.4. SEPT9 dans les tumeurs solides

Le gène *SEPT9* se situe dans une région de déséquilibre allélique au niveau du chromosome 17q25.3 dans le cancer du sein (Kalikin *et al.* 2000) et le cancer sporadique de l'ovaire (Russell *et al.* 2000). De plus, il existe une expression différentielle des isoformes de SEPT9 dans les tumeurs de différents tissus (McIlhatton *et al.* 2001; Hall and Russell 2004; Hall *et al.* 2005a; Scott *et al.* 2006). Le gène *SEPT9* a été caractérisé comme un gène candidat dans les carcinomes de cellules squameuses de la tête et du cou par un crible à l'échelle du génome pour des gènes méthylés (Bennett *et al.* 2008; Bennett *et al.* 2010). De plus, une récente étude a montré que la méthylation de l'ADN était un mécanisme important responsable d'une régulation d'expression différentielle d'isoformes de SEPT9, et que des échantillons de tumeurs mammaires montrent une localisation intracellulaire distincte de SEPT9 (Connolly *et al.* 2011b). Aussi, de l'ADN de *SEPT9* méthylé circulant dans le plasma a été récemment identifié comme biomarqueur d'intérêt pour une détection peu invasive du cancer colorectal. Ceci a conduit au développement d'un nouveau test de méthylation (m)SEPT9 qui pourrait s'avérer utile en recherche clinique pour la détection du cancer colorectal invasif par un simple prélèvement sanguin des patients (Grutzmann *et al.* 2008; Lofton-Day *et al.* 2008; deVos *et al.* 2009). Un test de dépistage du cancer du colon est déjà commercialisé par Epigenomics depuis 2009.

Enfin, une isoforme de SEPT9, SEPT9\_v1, pourrait devenir un biomarqueur important dans la résistance de nombreux cancers à des agents ciblant les microtubules. L'expression de SEPT9\_v1 a fortement été corrélée avec la sensibilité d'un grand nombre de cellules cancéreuses à des agents

thérapeutiques comme le paclitaxel (Amir and Mabweesh 2007). En général, les cellules cancéreuses avec une expression élevée de SEPT9\_v1 se montrent plus résistantes à ces médicaments anticancéreux (Amir and Mabweesh 2007).

Les isoformes de SEPT9 ont été associées avec des voies de signalisation en rapport avec l'oncogénèse. Par exemple, SEPT9\_v1 interagit avec le facteur HIF-1- $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1- $\alpha$ ), empêchant son ubiquitination et sa dégradation, ce qui active les gènes de survie en aval de HIF, favorisant la progression tumorale et l'angiogénèse dans les cellules cancéreuses de prostate (Amir *et al.* 2006).

L'expression de SEPT9 est également modulée dans de nombreux cancers, dont les tumeurs de la tête et du cou, de l'ovaire, de la prostate et du sein. Elle est également surexprimée dans un modèle viral de tumeur mammaire murine de tumorigénèse mammaire (Kalikin *et al.* 2000; Sorensen *et al.* 2000; Burrows *et al.* 2003; Montagna *et al.* 2003; Scott *et al.* 2005; Amir *et al.* 2006; Gonzalez *et al.* 2007; deVos *et al.* 2009). Plus récemment, il a été montré qu'une expression préférentielle de SEPT9\_v1 dans des cellules épithéliales mammaires humaines conduisait à des phénotypes pro-oncogéniques (Gonzalez *et al.* 2007). Dans cette étude, une expression ectopique de SEPT9\_v1, par l'utilisation de constructions rétrovirales dans deux lignées épithéliales mammaires humaines immortalisées, MCF10A et HPV4-12, augmente la prolifération cellulaire, décroît la réponse apoptotique et accroît la motilité et l'invasivité, en plus de présenter une réminiscence de transition épithélio-mésenchymateuse, soit toutes les caractéristiques de la transformation oncogénique de tissus épithéliaux. De plus, l'inhibition par siRNA de SEPT9, et spécifiquement de SEPT9\_v1, dans deux lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB-231 et BT-549 ayant des niveaux endogènes élevés de SEPT9\_v1, complète les observations faites dans le modèle d'expression ectopique en conduisant à des phénotypes tumorigènes. Un autre phénotype observé est que l'expression élevée de SEPT9\_v1 perturbe la bonne formation des microtubules dans les cellules en interphase et accroît l'aneuploïdie. Cette étude fournit des preuves convaincantes que SEPT9\_v1 peut diriger la progression maligne de cellules épithéliales mammaires (Gonzalez *et al.* 2007). Une autre étude de la même équipe a démontré que la surexpression de SEPT9\_v1 était capable d'augmenter le taux de prolifération des cellules épithéliales mammaires en stabilisant les kinases JNK (c-Jun-N-terminal kinase), qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire (Gonzalez *et al.* 2009). Une forte expression de SEPT9\_v1 augmente l'activité kinase de JNK et l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de JNK nécessaires à la progression du cycle cellulaire, dont la cycline D1 (Gonzalez *et al.* 2009).

Au vu des résultats de ces études, SEPT9 est maintenant admise comme nouvelle protéine associée au cancer, et pourrait devenir un biomarqueur dans le diagnostic et le traitement chimiothérapeutique de certains cancers épithéliaux.

### IV.3.3. Implication des autres septines

D'autres septines humaines ont été impliquées dans différents types de cancers, outre la leucémie myéloïde. Les septines SEPT2 et SEPT3 sont exprimées abondamment dans plusieurs tumeurs du cerveau et lignées cellulaires tumorales du cerveau, suggérant que ces membres sont des oncogènes potentiels (Kim *et al.* 2004). Il semble que la phosphorylation de SEPT2 par la caséine kinase 2 soit importante pour la prolifération de cellules d'hépatocarcinome (Yu *et al.* 2009). De plus, SEPT2 est la seule septine humaine ayant été associée au syndrome de Von Hippel-Landau (VHL), un syndrome à transmission autosomique dominante caractérisé par des hémangioblastomes dans différents tissus et des carcinomes des cellules rénales (Craven *et al.* 2006; Yu *et al.* 2009). Une étude protéomique montre que SEPT2 est inhibée sous l'expression de VHL dans la lignée cellulaire de carcinome rénal UMRC2, suggérant une régulation directe ou indirecte de SEPT2 par VHL (Craven *et al.* 2006; Yu *et al.* 2009).

SEPT4 agit comme un suppresseur de tumeur dans les leucémies et les tumeurs solides. Le gène *SEPT4* favorise l'apoptose, et est perdu chez 70% des patients atteints de leucémie (Larisch 2004), en plus d'être associé à l'inhibition de la tumorigenèse du cancer colorectal (Tanaka *et al.* 2002).

D'autres études montrent l'implication de SEPT7 dans les gliomes humains. Il a été démontré que l'expression de SEPT7 diminue dans les tissus tumoraux du système nerveux central (Hall *et al.* 2005a), cette diminution étant de plus de 50% dans 64 à 100% des astrocytomes diffus de faible grade (Huang *et al.* 2000a). Il apparaît que la transfection exogène de SEPT7 dans des gliomes inhibe la croissance tumorale et la prolifération, et provoque l'apoptose des cellules tumorales (Jia *et al.* 2007). SEPT7 jouerait donc un rôle suppresseur dans la croissance et la prolifération de cellules gliales.

Une récente étude sur l'expression de tous les membres des septines humaines a été menée dans 35 types de cancers, par l'utilisation d'une base de données de micro-array (Liu *et al.* 2010a). Cette étude montre une expression altérée de plusieurs septines dans différents types de cancers. En particulier, SEPT2, SEPT8, SEPT9 et SEPT11 se retrouvent surexprimées dans la plupart des cancers, alors que les SEPT4 et SEPT10 sont sous-exprimées. Par ailleurs, les expressions altérées de SEPT4, SEPT9 et SEPT10 ont également été significativement associées avec l'agressivité de la tumeur ou son pronostic (Liu *et al.* 2010a).

Ces résultats démontrent l'importance de la famille des septines dans la carcinogenèse et pourraient permettre d'identifier de nouvelles septines associées au cancer, ainsi que leurs rôles dans le développement du cancer.

## PARTIE III : LA CHIMIORESISTANCE

### I. LE CANCER DU SEIN

#### I.1. Généralités

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale et incontrôlée au sein d'un tissu sain de l'organisme, de telle manière que la survie de ce dernier est menacée. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer et former des métastases. Pour ces raisons, le dépistage du cancer doit être le plus précoce possible.

Le cancer du sein est une tumeur maligne de la glande mammaire qui se développe à partir des canaux (cancers canaux) ou des lobules (cancers lobulaires) de la glande mammaire. Ils sont dits « *in situ* » si les cellules cancéreuses sont confinées aux canaux et lobules, et « infiltrants » lorsque les cellules cancéreuses sont présentes dans les tissus qui les entourent. Le cancer du sein peut survenir également chez l'homme, mais il est rare, car environ 200 fois moins fréquent que chez la femme.

Le cancer du sein reste le carcinome le plus fréquent chez la femme, affectant près de 10% de la population féminine en France. Des études épidémiologiques ont montré que le risque de développement d'un cancer du sein augmentait avec l'âge, avec une tendance pour les plus jeunes à présenter une pathologie plus agressive. Le cancer du sein, qu'il soit avancé ou métastatique, représente actuellement la deuxième cause de mortalité féminine due au cancer après le cancer du poumon, avec un taux de mortalité de 17,8 décès pour 100 000 habitants en France. Selon une estimation, plus de 400 000 femmes en meurent chaque année dans le monde (Tubiana-Hulin 2005).

Le cancer du sein est souvent un cancer hormono-dépendant et les facteurs augmentant le taux d'œstrogènes sont donc à risque. Seulement 5 à 10% des cancers du sein diagnostiqués sont des cancers à prédispositions génétiques (Wooster and Weber 2003). En 2008, dix gènes étaient associés à un risque accru de cancer du sein. Neuf sont liés au système de réponse aux dommages de l'ADN. Le dixième code une protéine qui inhibe l'action de l'enzyme AKT1, enzyme dont l'inhibition joue aussi un rôle dans les cancers non génétiques. Deux de ces dix gènes, BRCA1 et BRCA2, sont à eux seuls responsables de la moitié de ces cancers à prédisposition génétique, soit 2,5 à 5% de tous les cancers du sein. Plus de 500 mutations ou variations de séquence ont déjà été décrites pour le gène BRCA1, localisé sur le chromosome 17, contre plus de 100 pour le gène BRCA2, localisé sur le chromosome 13. Seule une portion de toutes ces mutations accroissent le facteur de risque de cancer, avec une fréquence de mutations retrouvées de BRCA2 plus élevée que pour celles de BRCA1. Ces mutations



entraînent, outre une augmentation du risque de cancer du sein, une augmentation du risque de cancer de l'ovaire.

Il existe de nombreux traitements du cancer du sein, qui doivent être individualisés pour un traitement optimal. Pour le cancer du sein localisé, le traitement a presque toujours un objectif curatif. Il repose sur les quatre armes thérapeutiques que sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Pour le cancer du sein métastatique, il est rare de pouvoir proposer un traitement curatif à ce stade d'évolution. Le traitement repose essentiellement sur la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Le cancer du sein métastatique étant incurable, son traitement demeure essentiellement palliatif. La thérapie anticancéreuse permet seulement de retarder la progression de la maladie et d'améliorer la qualité de vie de la patiente. Durant ces vingt dernières années, l'incidence de la maladie, ainsi que sa mortalité ont reculé de façon encourageante. La baisse de 24% de la mortalité observée entre 2001 et 2004 est liée d'une part à un dépistage plus précoce des tumeurs, et d'autre part à une plus grande efficacité de la chimiothérapie envisagée (Bombonati and Sgroi 2011). Aujourd'hui, le taux global de survie relative à 5 ans après le diagnostic est de 85%.

## **I.2. Chimiothérapie anticancéreuse**

La chimiothérapie consiste à administrer des anticancéreux, seuls ou combinés, à intervalle fixe, en général toutes les 3 semaines. Le nombre de cures de chimiothérapie adjuvante, chimiothérapie réalisée après la chirurgie, varie entre 4 et 6 pour le cancer du sein. Les avantages des chimiothérapies adjuvantes par rapport au traitement chirurgical sans chimiothérapie sont une réduction significative de la mortalité et un taux de récurrence moindre. En 2005, la chimiothérapie adjuvante était recommandée en fonction du pronostic de la maladie, mais ne tenait pas compte des facteurs prédictifs de réponse aux traitements. Un facteur prédictif permet d'individualiser des patientes à forte ou faible probabilité de réponse à un traitement donné, alors qu'un facteur pronostique est indépendant du type de traitement reçu et permet de définir le niveau de risque de rechute et de décès dans une population donnée. Depuis, le choix de la chimiothérapie dépend d'un certain nombre de paramètres, dont la masse et les paramètres cinétiques liés à la tumeur, le niveau d'expression des récepteurs HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) et ER (oestrogen receptor) (les deux seuls facteurs prédictifs dans le traitement du cancer du sein), mais aussi les précédents traitements adjuvants administrés. Nombre de produits ont fait leurs preuves dans le cadre du traitement adjuvant du cancer du sein et ont un protocole de référence, mais d'autres produits continuent d'arriver sur le marché et font l'objet d'études.

Les anticancéreux utilisés dans les années 1970 étaient principalement les agents alkylants tels que le cyclophosphamide ou la combinaison de cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracile. Les agents alkylants empêchent la réplication de l'ADN alors que le methotrexate et le 5-fluorouracile font partie

de la classe des anti-métabolites. Ces anticancéreux ont été remplacés dans les années 1980 par les anthracyclines comme la doxorubicine et l'épirubicine, qui sont des inhibiteurs de topoisomérases II, utilisés seuls ou en traitement combiné.

Les taxanes, comme le paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) et le docétaxel (Taxotère<sup>®</sup>), qui ciblent les microtubules et bloquent la division cellulaire, ont été introduits dans les années 1990. Utilisés seuls ou en combinaison avec les agents alkylants ou les anthracyclines, ils ont permis d'améliorer la survie des patients atteints de cancer du sein métastatique.

Plus récemment, de nouvelles classes d'anticancéreux ont été introduites, incluant notamment les vinca-alcaloïdes, alcaloïdes végétaux ciblant les microtubules tels que la vinblastine, la vincristine et la vinorelbine, ou encore les dérivés du platine, ou le trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) (Tubiana-Hulin 2005). L'Herceptine est un anticorps monoclonal qui bloque l'activation des récepteurs membranaires HER2 au facteur de croissance épithélial (EGF) impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration ainsi que la différenciation de la cellule. Cet anticorps, qui empêche la dimérisation de ce récepteur annulant ainsi toute activité kinasique, n'est donc efficace que sur des cancers du sein où HER2 est surexprimée, soit environ 25% de ceux-ci, qui de plus sont souvent corrélés à un mauvais pronostic (Romond *et al.* 2005).

Depuis son autorisation de mise sur le marché français en 2007, le bévacizumab (Avastin<sup>®</sup>) est maintenant utilisé dans le cancer du sein en première ligne métastatique. C'est un anticorps monoclonal anti-VEGF, délivré en perfusion. Il se fixe spécifiquement sur le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et bloque ainsi la néoangiogenèse. Associé au Taxol, ce traitement double le temps de réponse (temps jusqu'à la progression de la maladie), toutefois sans augmentation du temps de survie (Miller *et al.* 2007). Enfin, le lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>), donné en traitement oral, est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs des facteurs de croissance HER2 et HER1, dont l'autorisation de mise sur le marché a été obtenue en 2008 (Geyer *et al.* 2006).

## II. LES ANTICANCEREUX CIBLANT LES MICROTUBULES

Les anticancéreux ciblant les microtubules ont démontré leur efficacité clinique, non seulement dans le traitement du cancer du sein, mais aussi dans le cancer du poumon, de l'ovaire, de la prostate, des tumeurs hématologiques et des tumeurs chez l'enfant (Pasquier and Kavallaris 2008).

Un nombre croissant d'anticancéreux empêche la formation et le fonctionnement normal des microtubules et du fuseau mitotique, causant l'arrêt des cellules en métaphase, les conduisant ainsi vers l'apoptose. Ils peuvent être classés selon leur capacité à stabiliser ou déstabiliser le réseau de microtubules et diffèrent par leur site de liaison à la tubuline (pour revue : Perez 2009; Calligaris *et al.* 2010).

### II.1. Les agents déstabilisateurs et stabilisateurs de microtubules

L'ancienne classification, basée sur l'effet déstabilisateur ou stabilisateur des agents ciblant les microtubules (Figure 26), s'est révélée trop simpliste. En effet, ces anticancéreux qui favorisent ou empêchent la polymérisation des microtubules à de fortes concentrations suppriment tous la dynamique microtubulaire à des concentrations 10 à 100 fois inférieures. A ces faibles concentrations, ces derniers stabilisent les microtubules d'un point de vue cinétique sans modifier la masse de polymère, induisant alors l'arrêt de la mitose et l'apoptose, ou inhibant la migration cellulaire (Pourroy *et al.* 2006; Braguer *et al.* 2008). A présent, on préfère classer ces agents anticancéreux selon leur site de liaison à la tubuline, bien que l'on continue à parler de molécules stabilisatrices/déstabilisatrices de microtubules.

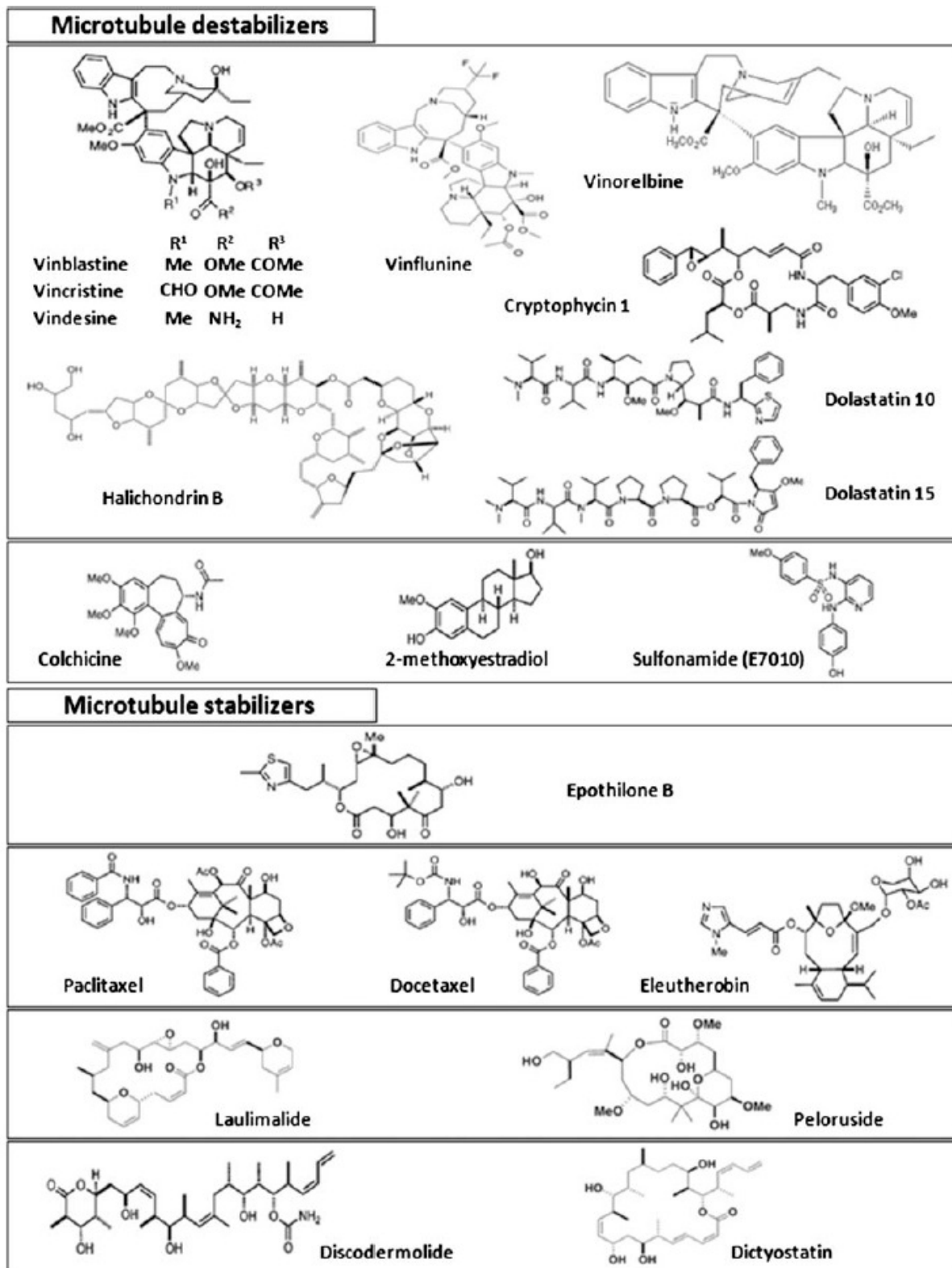


Figure 26 : Structure chimique des agents déstabilisateurs et stabilisateurs des microtubules

(Calligaris *et al.* 2010)

## II.2. Les différents sites de liaison à la tubuline des agents ciblant les microtubules

Il existe actuellement plus de 30 molécules différentes qui interagissent avec quatre sites principaux de liaison à la tubuline : le site taxane/épothilones, le site laulidamide/peloruside A, le site colchicine, et le site Vinca-alcaloïde (Figure 27). La différence essentielle réside dans le fait que certains agents anti-microtubules se fixent préférentiellement sur les dimères libres de tubuline et d'autres plutôt sur les microtubules polymérisés. Néanmoins, la liaison de molécules sur les 2 premiers sites aura plutôt tendance à stabiliser les microtubules alors que celle sur les 2 derniers sites induira préférentiellement une dépolymérisation.

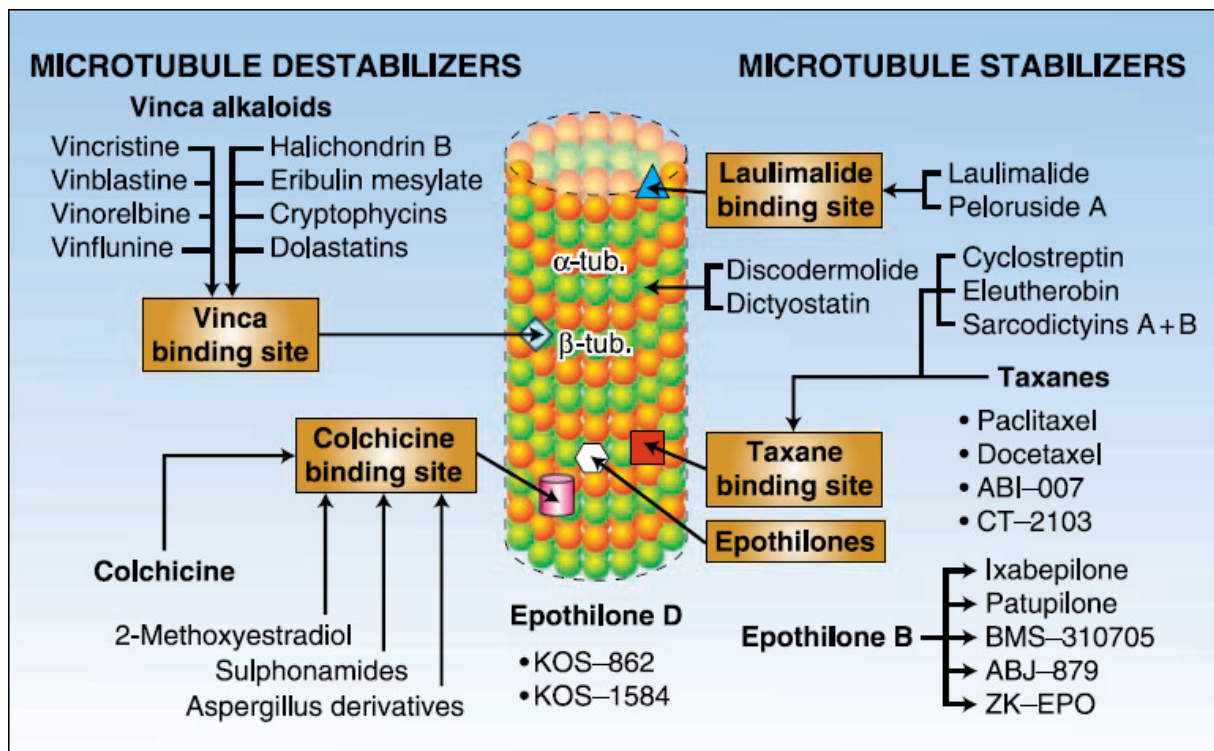


Figure 27 : Les différents sites de liaison à la tubuline des agents ciblant les microtubules

(Morris and Fournier 2008)

### II.2.1. Le site de liaison aux Vinca-alcaloïdes

Les Vinca-alcaloïdes se lient préférentiellement aux dimères de tubuline libre, mais également aux extrémités des microtubules. Le domaine de liaison des Vinca-alcaloïdes à la  $\beta$ -tubuline est en effet situé près du site de liaison interchangeable du GTP.

Les Vinca-alcaloïdes ont été classés parmi les agents déstabilisateurs. Inhibant en effet l'assemblage de la tubuline en microtubules, ils induisent la dépolymérisation des polymères déjà formés. La

progression mitotique est alors bloquée et la cellule meurt par apoptose. Ils sont communément utilisés en traitement de tumeurs solides ou de tumeurs hématologiques malignes et ont montré leur efficacité aussi bien en utilisation seule que combinée à d'autres agents cytotoxiques (Perez 2009).

A l'origine isolés à partir de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosae*), la vinblastine et la vincristine, aux structures presque identiques, sont les deux premiers Vinca-alcaloïdes à avoir été identifiés. Puis apparut la vinorelbine (Navelbine<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline) qui est un dérivé semi-synthétique de la vinblastine. Mais c'est la vinflunine, également un dérivé synthétique, qui présente l'activité *in vitro* la plus élevée de tous les Vinca-alcaloïdes, et dont l'efficacité a été démontrée dans le cancer du poumon non à petites cellules (Bennouna *et al.* 2006).

Des dérivés synthétiques d'autres composés naturels agissant au site de liaison des Vinca-alcaloïdes sont à l'étude (Morris and Fornier 2008). L'éribuline mesylate (E7389, Havalen<sup>™</sup>, Eisai) qui est un dérivé synthétique de l'halichondrine B, isolé de l'éponge marine *Halichondria okadaic* (Jordan *et al.* 2005), a été approuvé par la FDA en 2010 pour des patients atteints de cancer du sein métastatique ayant précédemment reçu au moins deux traitements chimiothérapeutiques à un stade avancé de la maladie, et a été approuvé par l'agence européenne EMA en mars 2011 pour les mêmes indications (Gourmelon *et al.* 2011). Le LY355703 est un dérivé synthétique des cryptophycines, des composés naturels isolés à partir d'une algue bleue-verte (D'Agostino *et al.* 2006), qui a démontré son efficacité dans le cancer de l'ovaire réfractaire aux dérivés du platine (D'Agostino *et al.* 2006).

De nombreuses dolastatines, isolées à partir d'un mollusque de l'océan Indien, *Dolabella auricularia*, et dépistées pour une activité antitumorale, se lient près du site de liaison des Vinca-alcaloïdes (Riely *et al.* 2007). Bien que de nombreux composés aient été testés, les résultats cliniques ont été décevants. Seule la Tasidotine (ILX651), un dérivé synthétique de la dolastatine-15, inhibe la nucléation des microtubules à de faibles concentrations, et pourrait potentiellement devenir un agent pharmacologique prometteur (Mita *et al.* 2006). Des études de phase II dans des mélanomes et le cancer du poumon non à petites cellules sont en cours.

### II.2.2. Le site de liaison à la Colchicine

La colchicine forme d'abord un complexe réversible en se liant à un dimère de tubuline, ce qui induit un changement conformationnel de la tubuline (Bhattacharyya and Wolff 1974), quasi irréversible.

Bien que la colchicine elle-même n'ait pas d'utilisation clinique dans le traitement du cancer, de nombreux composés par voie orale qui agissent au site de liaison de la colchicine sur la tubuline sont sous investigation pour une possible cytotoxicité. Ces agents incluent le 2-méthoxyoestradiol, les dérivés de sulfonamides, ainsi que des dérivés synthétiques d'espèces d'*Aspergillus* (Yee *et al.* 2005; Kamath *et al.* 2006; Nicholson *et al.* 2006). A l'heure actuelle, aucun composé dominant n'a émergé, mais il existe un fort potentiel de développement d'agents qui agiraient au niveau de ce site de liaison,

et qui pourraient théoriquement être utilisés en combinaison avec d'autres agents anti-microtubules ou d'autres agents thérapeutiques aux mécanismes d'action différents (pour revue : Morris and Fornier 2008).

### II.2.3. Le site de liaison au Laulimalide et au Peloruside

Le laulimalide est une substance naturelle de structure complexe issue d'éponges marines, qui se lie à l' $\alpha$ -tubuline (Figure 27) et favorise l'assemblage et la stabilisation du microtubule (Liu *et al.* 2007). Des expériences sur des xénogreffes chez la souris ont montré que cet agent anti-microtubule a un index thérapeutique étroit et une toxicité marquée, cependant sans preuve d'efficacité, limitant probablement son développement ultérieur (Liu *et al.* 2007).

Le peloruside A est un métabolite de l'éponge marine *Mycale hentscheli* de Nouvelle-Zélande, qui a une structure similaire à celle des épothilones et qui se lie à l' $\alpha$ -tubuline au niveau du site de liaison au laulimalide (Wilmes *et al.* 2007). Ce site de liaison différent de celui des taxanes laisse la possibilité de combiner les traitements qui agissent sur les sites de liaison du laulimalide et des taxanes. Un effet antiprolifératif synergique a déjà été observé *in vitro* (Hamel *et al.* 2006).

### II.2.4. Le site de liaison aux Epothilones et aux Taxanes

#### II.2.4.1. Epothilones

Les épothilones sont des antibiotiques de la famille des macrolides et représentent une nouvelle classe d'agents anti-microtubules. Ces molécules se lient à la  $\beta$ -tubuline de manière spécifique et indépendante des taxanes, suggérant des sites de liaison proches mais des pharmacophores distincts entre épothilones et taxanes. Les composés naturels épothilones A et B, produits par la myxobactérie *Sorangium cellulosum*, sont cytotoxiques *in vitro* (Gerth *et al.* 1996). Pour pallier aux difficultés pharmacocinétiques et à l'instabilité métabolique rencontrées avec les composés naturels, des dérivés synthétiques et semi-synthétiques ont été développés.

L'épothilone la plus étudiée cliniquement est l'ixabepilone (BMS-247550, Ixempra<sup>®</sup>, Bristol-Myers-Squibb) qui est un dérivé semi-synthétique de l'épothilone B. Des études *in vitro* ont montré que la cytotoxicité de l'ixabepilone est 2,5 fois plus élevée que celle du paclitaxel, et que cette activité est maintenue dans des lignées cellulaires résistantes au Taxol (Lee *et al.* 2001). En octobre 2007, l'ixabepilone a été approuvée par la FDA pour le cancer du sein métastatique. Un autre dérivé d'épothilone B, la patupilone (EPO906, Novartis), est jusqu'à 20 fois plus puissant que le paclitaxel dans diverses lignées cellulaires *in vitro* et son activité est également maintenue dans des lignées cellulaires résistantes au paclitaxel. La patupilone a montré une activité dans des modèles précliniques de tumeurs rares telles que les lignées cellulaires de myélome multiple, de carcinome hépatocellulaire,

et en combinaison avec l'imatinib dans un modèle de gliome chez le rat (Lin *et al.* 2005; O'Reilly *et al.* 2005; Mok *et al.* 2006). D'autres analogues semi-synthétiques de l'épothilone B se trouvent à différents stades de développement, comme le BMS-310705 (Sessa *et al.* 2007), l'ABJ-879 (Fumoleau *et al.* 2007) ou le ZK-EPO (Klar *et al.* 2006).

#### II.2.4.2. Discodermolide et Cyclostreptine

Le discodermolide, isolé de l'éponge marine *Discoderma dissoluta*, a montré une activité prometteuse *in vitro* et une synergie possible avec le paclitaxel, suggérant que leurs sites de liaison sont distincts mais son développement clinique a été freiné en raison d'une toxicité pulmonaire (Khrapunovich-Baine *et al.* 2009).

La cyclostreptine est à l'origine issue du milieu de fermentation d'une bactérie du genre *Streptomyces* (Buey *et al.* 2007). Elle se lie de façon covalente à la surface extérieure du microtubule, au niveau de pores formés entre deux dimères de tubuline, induisant la stabilisation du polymère.

#### II.2.4.3. Taxanes

Jusqu'à récemment, les seuls stabilisateurs de microtubules cliniquement importants étaient les taxanes. Ce sont des agents cytotoxiques largement utilisés pour leur activité dans de nombreuses tumeurs solides telles que le cancer du sein, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de l'ovaire, le cancer gastro-oesophagique, les tumeurs de cellules germinales et les cancers de la tête et du cou.

Le paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>, Bristol Myers Squibb) est originellement dérivé de l'écorce de l'if du Pacifique *Taxus brevifolia*, mais peut maintenant être partiellement synthétisé, tout comme le docetaxel (Taxotère<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis), à partir du précurseur 10-deacetylbaaccatin III, dérivé des aiguilles de l'if européen *Taxus baccata* (Rowinsky and Calvo 2006). L'hémi-synthèse du Taxol a été proposée pour la première fois au milieu des années 1980 par l'équipe de Pierre Potier à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette) (Gueritte-Voegelein *et al.* 1987). Les taxanes stabilisent les microtubules, favorisant d'une part la polymérisation des dimères et supprimant d'autre part la dynamique microtubulaire. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M conduit alors à la mort cellulaire par apoptose (Jordan 2002; Jordan and Wilson 2004). Le mécanisme d'action du Taxol sera développé dans le paragraphe suivant (voir II.3 Mécanisme d'action du Taxol).

Le site de liaison des taxanes à la tubuline est décrit depuis une dizaine d'années (Rao *et al.* 1995). Ils se lient à une sous-unité de  $\beta$ -tubuline à la surface intérieure du microtubule. Pour atteindre ce site de liaison dans la lumière du cylindre que forment les microtubules, il était admis que les taxanes diffusent à travers les pores présents à la surface du microtubule. Or des mesures cinétiques ont



démontré que la liaison du Taxol au microtubule était trop rapide pour qu'il y ait diffusion (Diaz *et al.* 2003). Un nouveau modèle propose que le Taxol, tout comme les autres taxanes, se lie temporairement à un site de faible affinité situé sur la face extérieure du microtubule, et pénètre ensuite dans la lumière du microtubule à travers les pores, où il atteint son site de liaison final, de forte affinité (Buey *et al.* 2007; Snyder 2007; Magnani *et al.* 2009).

Etant donné sa faible solubilité et la nécessité de le dissoudre dans des solvants tels que l'huile de ricin polyoxyéthylée (Cremophor EL<sup>®</sup>, BASF), il existe un risque de réaction d'hypersensibilité avec les taxanes, et particulièrement le paclitaxel, ce qui limite son utilisation. Ainsi, de nouvelles formulations du paclitaxel ont été développées pour pallier à ces problèmes. L'utilisation de l'ABI-007 (Abraxane<sup>®</sup>, Abraxis BioScience) est associée à une activité antitumorale plus importante et à des concentrations intracellulaires de principe actif plus élevées qu'avec le paclitaxel. Il a démontré une activité supérieure au paclitaxel dans une étude clinique de phase III dans le cancer du sein métastatique (Gradishar *et al.* 2005), ce qui lui a valu son approbation par la FDA en 2005. Outre le paclitaxel et le docetaxel, le cabazitaxel (Jevtana<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis) a montré des résultats prometteurs chez des patients atteints de cancer du sein ou de la prostate, et a été approuvé par la FDA en juin 2010 pour le traitement du cancer de la prostate métastatique hormono-résistant après échec de traitement au docetaxel (Dumontet and Jordan 2010; Michielsen *et al.* 2011).

Une autre étude clinique de phase II sur des cancers du sein métastatiques HER2-négatifs utilisant le CT-2103 (Xyotax<sup>®</sup>, Novartis), un conjugué de paclitaxel et d'acide  $\alpha$ -poly-L-glutamique, a été stoppée à cause d'une forte neurotoxicité et de réactions d'hypersensibilité chez plusieurs patientes (Lin *et al.* 2007). Le DJ-927 (Daiichi Sankyo Inc.) est un nouvel analogue du docetaxel ayant une meilleure solubilité et une biodisponibilité orale (Shionoya *et al.* 2003). Avec un mécanisme d'action similaire au paclitaxel et au docetaxel, le DJ-927 a un fort potentiel dans une variété de lignées cellulaires tumorales *in vitro* et *in vivo* (Shionoya *et al.* 2003).

La cytotoxicité du Taxol est exprimée par la valeur d'IC<sub>50</sub> (Concentration Inhibitrice de 50%), qui varie *in vitro* selon les lignées cellulaires et les conditions expérimentales (concentration de Taxol, durée d'exposition...) (Torres and Horwitz 1998; Hernandez-Vargas *et al.* 2007). Dans de nombreuses lignées cellulaires, l'IC<sub>50</sub> du Taxol est de l'ordre du nanomolaire (Braakhuis *et al.* 1994) et varie entre 2,5 et 7,5nM (Liebmann *et al.* 1993).

### II.3. Mécanisme d'action du Taxol

*In vitro*, contrairement à la plupart des molécules anti-néoplasiques, le Taxol n'a pas d'action directe sur la synthèse de l'ADN. Par contre, en se liant spécifiquement et fortement à la tubuline polymérisée, il favorise l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et, après stabilisation des polymères, empêche leur dépolymérisation (Parness and Horwitz 1981; Manfredi *et al.* 1982). Les microtubules formés en présence de cet agent thérapeutique possèdent en effet une stabilité inhabituelle et résistent à la dépolymérisation par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et le froid (Schiff *et al.* 1979). Le Taxol a également la capacité de polymériser la tubuline en absence de GTP qui est une condition absolue à la polymérisation des microtubules en conditions normales. De plus, il affecte la structure du microtubule, en réduisant le nombre de protofilaments d'une moyenne de 13 à 12 (Diaz *et al.* 1998).

Dans les cellules, des concentrations élevées de Taxol augmentent la masse du polymère et induisent la formation de faisceaux épais de microtubules, appelés « bundles », dans les cellules en interphase (Schiff and Horwitz 1980). Cependant, à de faibles concentrations de Taxol, pour lesquelles tous les sites de liaison ne sont pas occupés, son principal effet est de supprimer la dynamique microtubulaire, sans altérer la masse de polymère (Jordan *et al.* 1993; Derry *et al.* 1997).

Lors de la mitose, le Taxol supprime la dynamique du fuseau microtubulaire, permettant l'attachement du microtubule mais altérant la tension à travers le kinétochore (Yvon *et al.* 1999; Kelling *et al.* 2003; Kienitz *et al.* 2005). Ces perturbations retardant ou bloquant la transition métaphase-anaphase (Jordan and Wilson 2004) ne satisfont pas le checkpoint d'assemblage du fuseau mitotique et provoquent l'arrêt de la mitose ce qui conduit à la mort cellulaire (Rieder and Maiato 2004).

Plus précisément, des études récentes (Brito *et al.* 2008; Gascoigne and Taylor 2008; Shi *et al.* 2008; Steen *et al.* 2008; Gascoigne and Taylor 2009) utilisant la vidéomicroscopie *in vivo* ont mis en évidence les effets complexes des agents anti-microtubules sur l'arrêt de la mitose et la mort cellulaire.

Pour maintenir l'intégrité du génome et réduire l'incidence d'une aneuploïdie, le checkpoint mitotique retarde l'anaphase et la sortie de la mitose jusqu'à ce que tous les kinétochores soient attachés aux microtubules. Si un seul kinétochore n'est pas attaché, un retard prolongé (environ 20h) provoquera la sortie de la mitose et la formation de cellules tétraploïdes. Ce délai est dû à l'inhibition du complexe APC (anaphase promoting complex), une E3 ubiquitine-ligase qui agit pour promouvoir la dégradation du complexe cycline B1/p34<sup>cdc2</sup> kinase et d'autres protéines mitotiques. APC est couplé à la protéine activatrice Cdc20, phosphorylée en partie par ERK (Chung and Chen 2003). Les protéines du checkpoint, notamment Bub1, BubR1, Bub3, Mad1 et Mad2, sont recrutées aux kinétochores non attachés avant l'anaphase, où elles inhibent Cdc20 (et donc APC) (Figure 28) (Bharadwaj and Yu 2004; Kops *et al.* 2005). Bien que ce checkpoint mitotique ait été initialement examiné en utilisant le nocodazole, un agent déstabilisateur de microtubules, il semble que le Taxol active également cette même voie (Sorger *et al.* 1997; Waters *et al.* 1998; Martinez-Exposito *et al.* 1999; Huang *et al.*

2000b). Bien que le mécanisme principal soit bien compris, les conséquences en termes de signalisation menant à la mort cellulaire continuent d'être explorées (Blagosklonny and Fojo 1999; Bergstralh and Ting 2006).

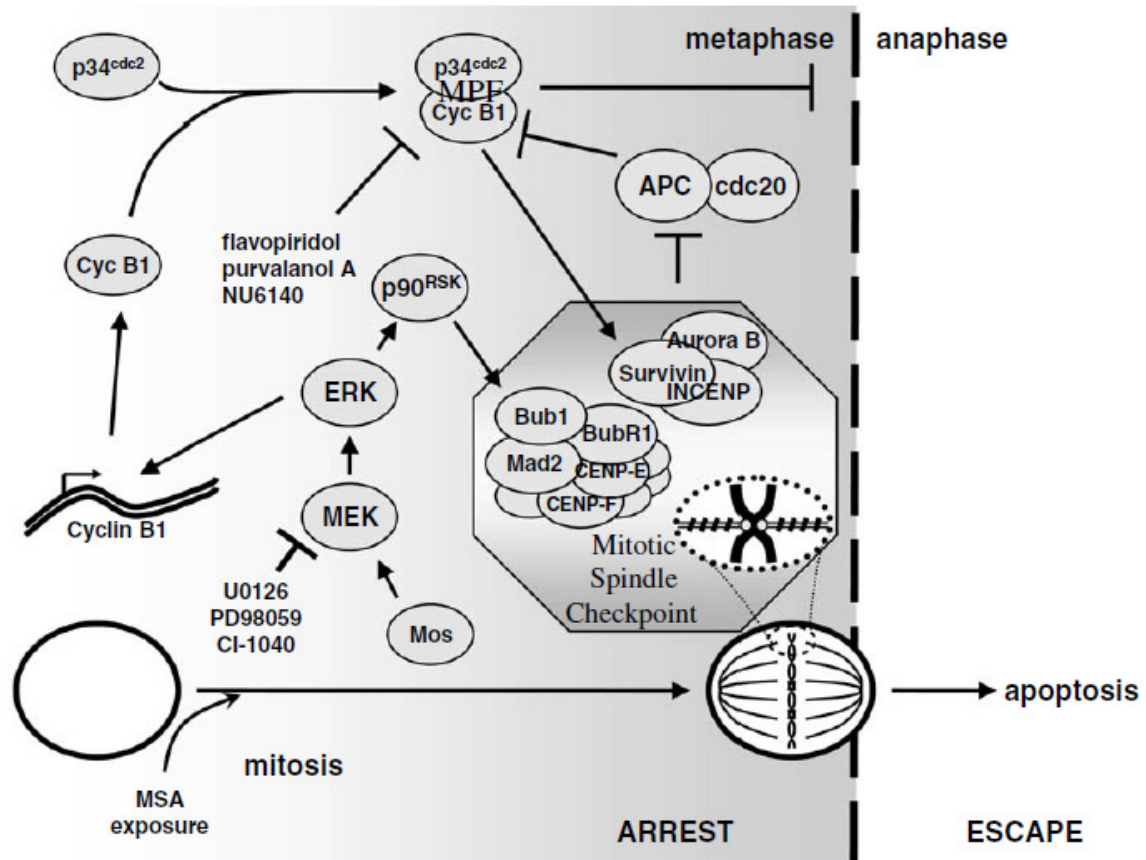


Figure 28 : Arrêt de la mitose par le checkpoint du fuseau mitotique suite à une exposition au Taxol (Bergstralh and Ting 2006)

La voie du suppresseur de tumeur p53 est l'exemple même du checkpoint du cancer, puisqu'il contrôle l'intégrité du génome à l'entrée de la phase S (Eastman 2004). Bien que p53 ait été intensément étudié en relation avec une exposition au Taxol, son importance dans la mort cellulaire induite par les agents stabilisateurs de microtubules est controversée. La majorité des études suggère que le statut de p53 n'affecte pas la sensibilité au Taxol et également que l'apoptose induite par le Taxol est indépendante de p53 (Woods *et al.* 1995; Debernardis *et al.* 1997; Weinstein *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 2000; Reinecke *et al.* 2005; Sezgin *et al.* 2005).

Cependant, malgré son succès clinique, l'efficacité du Taxol est souvent limitée par l'émergence de chimiorésistances et explique qu'il ne soit plus communément utilisé qu'en deuxième intention, notamment dans le cancer du sein.

### III. LA CHIMIORESISTANCE AU TAXOL

La résistance intrinsèque ou acquise aux taxanes est fréquente et limite leur efficacité (Zhou and Giannakakou 2005). La chimiorésistance au Taxol est un phénomène multifactoriel impliquant différents mécanismes comme notamment une surexpression de la P-glycoprotéine (van Ark-Otte *et al.* 1998), des mutations des gènes d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline (Berrieman *et al.* 2004), des modifications dans la composition des microtubules en isotypes de  $\beta$ -tubuline (Burkhart *et al.* 2001) et une augmentation de la dynamique microtubulaire associée à une altération d'expression de MAPs (Goncalves *et al.* 2001). De plus, des aberrations fonctionnelles au niveau de nombreuses voies de signalisation, du contrôle du cycle cellulaire, de la croissance et de l'apoptose peuvent toutes contribuer à la chimiorésistance (Villeneuve *et al.* 2006). Etant donné que la majorité des marqueurs biologiques identifiés à ce jour dans le domaine de la résistance au Taxol se sont avérés être de nature pronostique plutôt que prédictive, limitant leur intérêt pour le choix d'un traitement chez un patient donné, il est donc capital d'élucider le rôle complexe joué par certains facteurs dans la résistance aux taxanes pour une meilleure compréhension de leur utilisation en clinique (pour revue : McGrogan *et al.* 2008).

#### III.1. Efflux par la P-Glycoprotéine

Un des premiers mécanismes de résistance mis en place par la cellule, et également le mieux décrit dans la littérature, est l'efflux de l'agent thérapeutique par la P-glycoprotéine (P-gp). La multirésistance (MDR pour multi-drug resistance) est un phénomène dans lequel la résistance à une molécule peut provoquer une résistance croisée à d'autres molécules, menant à un phénotype multirésistant (Jordan *et al.* 1996). Un mécanisme clé à la base de la multirésistance repose sur l'expression de la famille de transporteurs ATP-dépendants connus sous le nom d'ATP-binding cassette (ABC) (Gottesman 2002). Un des premiers membres décrits de cette famille de pompes d'efflux énergie-dépendantes est la P-glycoprotéine (P-gp), également nommée ABCB1 et codée par le gène MDR-1 (Leonessa and Clarke 2003). La P-gp augmente l'efflux des molécules hors de la cellule, diminuant ainsi le niveau intracellulaire de l'agent thérapeutique et provoquant une résistance à ce dernier (Dumontet and Sikic 1999). La P-gp peut se lier à de nombreux anticancéreux tels que le paclitaxel, la doxorubicine, la vincristine et la vinblastine (Schinkel *et al.* 1997). Des expériences de surexpression de la P-gp ont permis de rendre résistantes des cellules qui étaient sensibles à la colchicine, la doxorubicine ou la vinblastine (Ueda *et al.* 1987). L'évaluation par PCR du niveau d'expression de MDR-1 dans 60 lignées cellulaires a démontré que plus celui-ci est faible, plus les lignées cellulaires sont sensibles au Taxol (Alvarez *et al.* 1995).

L'importance de l'expression de la P-gp dans le cancer du sein a largement été étudiée (Kroger *et al.* 1999; Leonessa and Clarke 2003). Une étude a montré que des niveaux élevés d'expression de P-gp sont associés de manière significative à une survie sans récurrence raccourcie chez des patientes atteintes de cancer mammaire sans chimiothérapie, en comparaison avec des patientes P-gp négatives (Tsukamoto *et al.* 1997). À l'inverse, d'autres études n'ont trouvé aucune corrélation entre l'expression de la P-gp et la réponse à un traitement au paclitaxel ou au docetaxel chez des patientes atteintes de cancer du sein (Schneider and Romero 1995; Schneider *et al.* 2000; Kanzaki *et al.* 2001).

En ce qui concerne les inhibiteurs de P-gp, le verapamil et la cyclosporine A ont démontré leur efficacité à réverser le phénotype MDR-1 dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ovariennes humaines résistantes au Taxol (Johnson *et al.* 1994). Cependant, les premiers essais cliniques ont montré que des concentrations plasmatiques élevées en inhibiteurs de P-gp, nécessaires pour réverser le phénotype MDR, ont augmenté la toxicité chez la patiente et n'ont pas réussi à restaurer une réponse au traitement dans des tumeurs exprimant MDR-1 (Sikic 1997; Toppmeyer *et al.* 2002). Malgré le développement d'inhibiteurs de seconde (biricodar, valsopodar) et de troisième génération (tariquidar, ONT-093), la thérapie inhibitrice de P-gp a montré peu de valeur clinique globale dans la restauration de la sensibilité tumorale, avec des effets secondaires non négligeables (Chi *et al.* 2005; Pusztai *et al.* 2005).

Une autre classe de pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux taxanes est la protéine MRP (multiresistance-associated protein) de la famille des transporteurs ABCC (ATP-binding cassette C group) (Borst *et al.* 2000; Hopper-Borge *et al.* 2004). Un des membres de cette famille, MRP1, a été identifié à l'origine par sa surexpression dans une lignée cellulaire cancéreuse de poumon résistante à la doxorubicine, en absence d'expression de P-gp (Cole *et al.* 1992). Il a été montré que l'expression de MRP1 conférait une résistance à plusieurs anticancéreux, dont les anthracyclines, la vincristine, et dans une moindre mesure la vinblastine et le Taxol (Cole *et al.* 1994). Les énantiomères de verapamil modulent différemment la protéine MRP1, en inhibant (R-verapamil) ou en stimulant (S-verapamil) la mort de cellules surexprimant cette pompe d'efflux (Perrotton *et al.* 2007). Par ailleurs, alors que les vinca-alcaloïdes sont activement transportés par MRP1, les taxanes sont des substrats de MRP2 et de MRP7, et l'épothilone B est transportée par MRP7 (Breuninger *et al.* 1995; Hopper-Borge *et al.* 2004; Huisman *et al.* 2005). Il a de plus été rapporté que le transporteur MRP7 (ABCC10) était capable de conférer une résistance *in vivo* à une variété d'agents anticancéreux et notamment les taxanes (Hopper-Borge *et al.* 2010).

### III.2. Altération de la dynamique microtubulaire

Etant donné que le Taxol ne se fixe que sur la tubuline polymérisée, et non sur les dimères de tubuline libres, des mécanismes cellulaires visant à sélectionner un polymère moins stable, c'est-à-dire un polymère ayant une dynamique microtubulaire accrue, peuvent également être à l'origine de phénomènes de chimiorésistance à des agents stabilisateurs de microtubules comme le Taxol (pour revue : Orr *et al.* 2003).

La résistance aux agents se liant à la tubuline a depuis longtemps été associée à la présence d'altérations de la stabilité du microtubule (Cabral *et al.* 1986; Minotti *et al.* 1991). Selon ces auteurs, certaines cellules contiennent des microtubules hypostables, ayant une tendance à la dépolymérisation, et des microtubules hyperstables, avec une relative résistance à la dépolymérisation. Les cellules ayant des microtubules hypostables sont particulièrement sensibles aux agents dépolymérisants et affichent une hypersensibilité aux Vinca-alcaloïdes, alors qu'elles résistent aux agents stabilisateurs, et inversement avec des microtubules hyperstables. De plus, ceci pourrait expliquer le phénomène selon lequel certaines lignées cellulaires résistantes deviennent dépendantes du Taxol, et ne peuvent plus pousser qu'en présence de Taxol (Schibler *et al.* 1989). La dépendance au Taxol serait due à la présence de microtubules hautement hypostables qui, en absence d'agent stabilisateur, se désassemblent spontanément, les rendant incompatibles avec des fonctions cellulaires normales.

Par ailleurs, l'utilisation de concentrations appropriées de vinblastine et de Taxol a démontré que les agents dépolymérisants et stabilisateurs exercent une activité antimittotique en réduisant la dynamique du fuseau microtubulaire, sans altération significative de la distribution de tubuline entre les formes solubles et polymérisées (Jordan *et al.* 1991; Jordan *et al.* 1993). L'analyse des effets du Taxol à de faibles concentrations a révélé une forte réduction de la dynamique microtubulaire, sans altération significative de la longueur des microtubules.

C'est ce que l'on peut observer avec les lignées cellulaires A549-T12 et -T24, respectivement 9 et 17 fois plus résistantes au Taxol que la lignée sensible d'origine, qui sont dépendantes de faibles concentrations de Taxol (2nM) pour leur croissance et qui se retrouvent bloquées en phase G2/M du cycle cellulaire en absence de Taxol (Goncalves *et al.* 2001). Ces deux lignées résistantes présentent en effet une instabilité dynamique accrue (microtubules hypostables), comparé à la lignée sensible dont elles sont issues.

Par ailleurs, certains auteurs ont démontré, par l'emploi de concentrations appropriées de vinblastine et de Taxol, que les agents dépolymérisants et stabilisateurs exercent tous une activité antimittotique en réduisant la dynamique du fuseau microtubulaire, sans altération significative de la distribution de tubuline entre les formes solubles et polymérisées (Jordan *et al.* 1991; Jordan *et al.* 1993).

Ces deux modèles diffèrent significativement quant à la prédiction de la résistance croisée des Vinca-alcaloïdes et des taxanes. Le modèle de Cabral (Cabral *et al.* 1986) suggère que les cellules résistantes aux agents dépolymérisants sont sensibles aux agents stabilisateurs, et inversement. En revanche, dans le modèle de Jordan et Wilson (Jordan *et al.* 1993), les deux types de composés exercent le même effet suppressif sur la dynamique microtubulaire, et les cellules résistantes à une classe de composés pourraient présenter une résistance croisée à l'autre classe (pour revue : Dumontet and Sikic 1999).

### III.3. Modification de l'expression de gènes de $\beta$ -tubuline

#### III.3.1. Mutations de gènes de tubuline

La plupart des mutations de gènes de tubuline identifiées à ce jour et impliquées dans le phénomène de chimiorésistance concernent l'isotype  $\beta$ I de tubuline (Berrieman *et al.* 2004). Il a été montré que des mutations au niveau de gènes de  $\beta$ -tubuline peuvent provoquer des modifications de la dynamique et de la stabilité des microtubules (Gonzalez-Garay *et al.* 1999), mais aussi altérer la liaison d'agents anti-microtubules tels que le Taxol aux sous-unités de  $\beta$ -tubuline (Berrieman *et al.* 2004). Il a également été reporté que les lignées cellulaires s'adaptent au traitement chimiothérapeutique par l'acquisition de mutations de tubuline spécifiquement au niveau du site d'interaction avec le Taxol, affaiblissant la liaison entre la  $\beta$ -tubuline et le Taxol (Hua *et al.* 2001; Kavallaris *et al.* 2001; Martello *et al.* 2003; Hari *et al.* 2006). *In vitro*, des mutations de  $\beta$ -tubuline ont notamment été retrouvées au niveau du résidu Leucine (L215) dans une région proche du site de fixation au Taxol, qui déstabilisent l'assemblage des microtubules, accroissant ainsi la résistance au Taxol (Wang *et al.* 2006b). Des mutations par substitutions dans le gène de la  $\beta$ I-tubuline ont également été retrouvées dans deux lignées cellulaires de carcinomes ovariens résistants au Taxol, dont une située dans la région proche du site de liaison au Taxol (Giannakakou *et al.* 1997). Par ailleurs, il semble que l'absence de p53 conduise à une fréquence plus élevée de mutations de  $\beta$ -tubuline (Warnick *et al.* 2001). En effet, les mutations de  $\beta$ -tubuline identifiées dans les cellules résistantes 1A9 résulteraient de la présence d'un gène de p53 fonctionnellement inactif (Sale *et al.* 2002). Néanmoins, peu de preuves cliniques existent *in vivo* indiquant que les mutations de  $\beta$ -tubuline jouent un rôle important dans la résistance aux taxanes.

Dans une moindre mesure, la résistance au Taxol a également été associée à des mutations de gènes d' $\alpha$ -tubuline dans la lignée cellulaire de cancer du poumon non à petites cellules (Martello *et al.* 2003). Ces mutations d' $\alpha$ -tubuline semblent affecter la liaison des MAPs et seraient ainsi à l'origine de la résistance aux agents anti-microtubules.

### III.3.2.Composition en isotypes de $\beta$ -tubuline

Il existe sept isotypes de  $\beta$ -tubuline chez l'Homme (Berrieman *et al.* 2004). L'isotype  $\beta$ V de tubuline a été récemment cloné et son profil d'expression a été étudié par une approche protéomique dans plusieurs lignées cellulaires humaines (Verdier-Pinard *et al.* 2005). D'un point de vue structural, les isotypes de  $\beta$ -tubuline diffèrent au niveau des 15-20 acides aminés (Burkhart *et al.* 2001) de la région C-terminale qui est d'ailleurs le site de liaison potentiel de nombreuses MAPs (Valiron *et al.* 2001). Les différents isotypes de  $\beta$ -tubuline ont une distribution variant d'un tissu à un autre, ce qui suggère que l'expression différentielle d'isotypes pourrait avoir une signification fonctionnelle (Berrieman *et al.* 2004). Les isotypes  $\beta$ I et  $\beta$ IVa de tubuline sont constitutivement exprimés, alors que les autres isotypes semblent tissu-spécifiques (Yusuf *et al.* 2003).

De manière intéressante, il a été montré que les microtubules composés de dimères  $\alpha/\beta$ III-tubuline sont moins stables, comparé à des polymères renfermant d'autres isotypes de  $\beta$ -tubuline (Panda *et al.* 1994; Derry *et al.* 1997). Plus précisément, les microtubules composés entièrement de  $\beta$ III-tubuline ont une dynamique microtubulaire accrue, qui se traduit par une augmentation du taux global d'échange de dimères de tubuline à leurs extrémités (Panda *et al.* 1994). De même, il a été montré que des microtubules isotypiquement purs, composés de  $\beta$ III ou de  $\beta$ IV-tubuline, nécessitent un ratio plus élevé de Taxol lié au microtubule pour induire sa stabilité (Derry *et al.* 1997). La réponse au Taxol semble donc affectée par la composition en isotypes de  $\beta$ -tubuline au sein des microtubules, et la surexpression de  $\beta$ III et  $\beta$ IV-tubuline pourrait être un mécanisme possible de résistance au Taxol. En effet, des expériences d'inhibition de  $\beta$ III-tubuline avec des oligonucléotides antisens ont permis d'accroître de 39% la sensibilité au Taxol de cellules A549-T24 résistantes à cet agent anti-microtubule (Kavallaris *et al.* 1999). Ces résultats ont par la suite été confirmés par siRNA (Gan *et al.* 2007; Stengel *et al.* 2010). La résistance au Taxol de tumeurs ovariennes a également été associée à une surexpression de  $\beta$ I,  $\beta$ III et  $\beta$ IV-tubuline (Kavallaris *et al.* 1997; Mozzetti *et al.* 2005), et des résultats similaires ont été mis en évidence pour la  $\beta$ III-tubuline dans le cancer du sein avancé utilisant le Taxol en première ligne thérapeutique (Paradiso *et al.* 2005; Tommasi *et al.* 2007). Cependant, malgré la corrélation entre la surexpression de  $\beta$ III-tubuline et la résistance au Taxol *in vitro* (Kavallaris *et al.* 1999; Nicoletti *et al.* 2001), aucune correspondance n'a pu être trouvée entre les niveaux d'expression de  $\beta$ III-tubuline et la résistance au Taxol dans une cohorte de 12 xénogreffes de carcinomes ovariens issus de patientes avant et après un traitement au Taxol (Nicoletti *et al.* 2001). Il faut cependant préciser que les expériences réalisées *in vitro* utilisent généralement de fortes concentrations d'agents inhibiteurs de microtubules qui pourraient altérer la composition en isotypes de tubuline, biaisant ces méthodes et ne reflétant plus l'action de ces agents anti-microtubules dans le contexte clinique (McGrogan *et al.* 2008).



### III.3.3. Modifications post-traductionnelles de tubuline

La diversité structurale de la tubuline est encore augmentée par l'étendue des modifications post-traductionnelles. A l'exception de l'acétylation, toutes les modifications post-traductionnelles interviennent à l'extrémité C-terminale de la tubuline, où plusieurs MAPs interagissent. Il a d'ailleurs été mis en évidence que certaines modifications post-traductionnelles réversibles régulent l'interaction de certaines MAPs avec les microtubules, modulant ainsi la dynamique microtubulaire. Ainsi, la capacité de tau, MAP2 et de la kinésine à interagir *in vitro* avec les microtubules est notamment régulée par le niveau de polyglutamylation d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline (Boucher *et al.* 1994; Larcher *et al.* 1996; Bonnet *et al.* 2001). Les niveaux de glutamylation et de polyglutamylation de la tubuline dépendent du cycle cellulaire (Bobinnec *et al.* 1998; Regnard *et al.* 1999). Bien qu'il y ait un pic d'activité enzymatique en phase G2, le niveau de tubuline glutamylée est maximal au cours de la mitose, suggérant une régulation complexe qui impliquent des activités polyglutamylase et déglutamylase.

Par ailleurs, la phosphorylation pourrait également réguler la stabilité des microtubules. Sur les 7 isotypes de  $\beta$ -tubuline existantes, seule la  $\beta$ III, souvent surexprimée dans les cellules résistantes au Taxol, est phosphorylée. Et il a été montré que la déphosphorylation de cet isotype par la protéine phosphatase 2A (PP2A) inhibe *in vitro* l'assemblage des microtubules stimulé par MAP2 (Khan and Luduena 1996).

Seules quelques expériences suggèrent une régulation différente des modifications post-traductionnelles de la tubuline après traitement par le Taxol. Ainsi, des expériences d'électrophorèse bidimensionnelle sur des cellules de carcinome embryonnaire P19 ont mis en évidence l'expression d'isoformes plus acides, glutamylés, de  $\beta$ III-tubuline (Laferriere and Brown 1996). Dans le cas de cellules humaines de carcinome du poumon à petites cellules résistantes au Taxol, une augmentation de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline a été observée (Ohta *et al.* 1994). Ces modifications peuvent cependant ne refléter qu'une préférence de substrat, à savoir entre le polymère ou le dimère, des enzymes impliquées, et ne seraient pas directement associées à la résistance au Taxol. A ce jour, il y a peu de preuves que l'altération de modifications post-traductionnelles soit un déterminant majeur de sensibilité cellulaire envers le Taxol ou n'importe quel autre agent antimittotique ciblant la tubuline (pour revue : Orr *et al.* 2003).

## III.4. Modification de l'expression de protéines régulatrices de la dynamique microtubulaire

### III.4.1. Stabilisation par les MAPs

Les MAPs jouent un rôle évident dans la sensibilité cellulaire aux agents anti-microtubules de par leur interaction avec les microtubules qui module leur stabilité (Orr *et al.* 2003).

#### III.4.1.1. Stabilisation par la protéine tau

La protéine tau se lie à la tubuline polymérisée par l'intermédiaire de domaines de liaison au microtubule répétés trois ou quatre fois, appelés 3R ou 4R. Sa fonction principale est de permettre l'assemblage des dimères de tubuline et la stabilisation du microtubule (Wagner *et al.* 2005). Le nombre de répétitions du domaine de liaison effectue la capacité de tau à stabiliser les microtubules, avec un effet stabilisateur plus important avec tau 4R que 3R (Bunker *et al.* 2004). Tau se lie longitudinalement à la surface interne et externe du microtubule, entre deux dimères adjacents de tubuline, et a été retrouvée se liant au site de liaison du Taxol à la surface interne du microtubule (Kar *et al.* 2003; Dehmelt and Halpain 2005).

Tau se lie différenciellement aux microtubules en fonction de la présence ou de l'absence de Taxol (Makrides *et al.* 2004). En absence de Taxol, tau se lie fortement aux microtubules et se dissocie lentement, alors qu'en présence de Taxol, tau se lie modérément aux microtubules, ce qui augmente la polymérisation induite par le Taxol, puis se dissocie rapidement (Wagner *et al.* 2005). Il a été montré dans une étude sur des patients atteints de cancer du sein ayant un traitement combiné de paclitaxel, 5-fluorouracile, doxorubicine et cyclophosphamide, que des niveaux élevés de tau sont associés à des tumeurs résiduelles et à une résistance au traitement (Rouzier *et al.* 2005). Cependant, la moitié des patients de cette étude ayant un faible niveau de tau étaient résistants au traitement, indiquant que la résistance au Taxol est un phénomène multifactoriel qui ne peut être prédit par les seuls niveaux d'expression de tau. Plusieurs autres études montrent de la même manière qu'un faible niveau de tau semble associé à une meilleure réponse au Taxol (Mimori *et al.* 2006; Andre *et al.* 2007; Bhat and Setaluri 2007; Tanaka *et al.* 2009; Shao *et al.* 2010). Cependant, les données de la littérature doivent donc être interprétées avec précaution, puisqu'un niveau d'expression élevé de tau a également été décrit comme étant un facteur de bon pronostic (Smoter *et al.* 2011).

### III.4.1.2. Stabilisation par MAP4

MAP4, dont l'activité est régulée par phosphorylation (Honore *et al.* 2005), stabilise les microtubules en augmentant la fréquence des sauvetages, et semble être impliquée dans la régulation de la dynamique microtubulaire lors de la mitose (Hyman and Karsenti 1996; Dehmelt and Halpain 2005). Phosphorylée, MAP4 est inactivée et se dissocie du microtubule, permettant à la mitose de se poursuivre (Poruchynsky *et al.* 2001). Ainsi, l'inhibition ou l'inactivation de MAP4 pourrait accroître la dynamique microtubulaire et favoriser la résistance au Taxol (Orr *et al.* 2003) de même qu'une surexpression de MAP4, quand p53 est inactif, a été corrélée à une augmentation de la sensibilité à cette molécule (Murphy *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1998). Cependant, MAP4 reste liée aux microtubules dans les lignées cellulaires de carcinome ovariens résistants au Taxol 1A9PTX10 et 1A9PTX22 (Poruchynsky *et al.* 2001).

### III.4.2. Déstabilisation par la stathmine

La stathmine, également appelée oncoprotéine 18, est une phosphoprotéine déstabilisatrice de microtubules, qui régule la dynamique microtubulaire aussi bien en interphase qu'en mitose (Rubin and Atweh 2004). *In vitro*, la stathmine, en se liant aux microtubules, est impliquée dans la régulation du fuseau mitotique, augmentant le taux de catastrophe aux extrémités (+) et (-) des microtubules (Hyman and Karsenti 1996; Honore *et al.* 2005; Manna *et al.* 2006). Ainsi, une dérégulation de la stathmine peut provoquer une réduction du fonctionnement du fuseau mitotique et une résistance au Taxol et à la vinblastine (Alli *et al.* 2002). D'un point de vue structural, la stathmine possède deux domaines fonctionnels consistant en un domaine N-terminal ayant la capacité de promouvoir des catastrophes, et un domaine C-terminal qui séquestre la tubuline (Honore *et al.* 2005). Non phosphorylée, la stathmine ne peut se lier à la tubuline et il en résulte une stabilisation du réseau de microtubules (Curmi *et al.* 1999; Honore *et al.* 2005). En effet, l'expression d'une stathmine non phosphorylable (inactive) cause des défauts au niveau du checkpoint d'assemblage du fuseau mitotique et l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Cassimeris 2002).

Une surexpression de stathmine pourrait donc être un mécanisme possible de résistance au Taxol et a d'ailleurs été retrouvée aussi bien dans le cancer du sein (Bieche *et al.* 1998; Alli *et al.* 2002) que dans des leucémies (Melhem *et al.* 1997). Cette dérégulation semble accroître le taux de catastrophe, et par voie de conséquence réduire la liaison du Taxol au microtubule, menant à une augmentation de la résistance à cet anticancéreux (Alli *et al.* 2002). Inversement, l'inhibition de l'expression de la stathmine par siRNA accroît la sensibilité au Taxol (Iancu *et al.* 2001).

### III.5. Altération du cycle cellulaire et des voies de signalisation

Beaucoup de protéines clés modulant diverses voies de signalisation sont localisées au niveau des microtubules (Gundersen and Cook 1999; Hollenbeck 2001; Cardone *et al.* 2002), et des molécules comme le Taxol qui lient la tubuline vont avoir la capacité de moduler diverses voies de signalisation. En effet, on sait que le Taxol induit aussi bien des voies de signalisation qui mènent à l'apoptose (voies JNK et p38) que d'autres qui sont typiquement associées à la différenciation et prolifération cellulaires (voie MEK/ERK).

#### III.5.1. La voie MEK/ERK

L'activation de la cascade de signalisation MEK/ERK en réponse aux perturbations de la dynamique des microtubules a été bien documentée (Shinohara-Gotoh *et al.* 1991; Schmid-Alliana *et al.* 1998; McDaid and Horwitz 2001). L'inhibition de la voie anti-apoptotique MEK/ERK par différents agents pharmacologiques associée à un traitement au Taxol entraîne une augmentation significative de l'apoptose dans divers types cellulaires (McDaid and Horwitz 2001), qui résulterait d'une importante diminution de l'activité de la protéine anti-apoptotique Akt et plus globalement de la voie de signalisation PI3K-Akt (MacKeigan *et al.* 2002). L'effet cytotoxique accru du Taxol en présence d'inhibiteurs de MEK peut être lié à la répression de la fonction de survie de la voie de signalisation MEK/ERK mais aussi à une augmentation de la polymérisation des microtubules, étant donné que l'activation de MAPK semble inhiber leur stabilisation (Shinohara-Gotoh *et al.* 1991). Un rapport a suggéré que MAPK est exprimée dans approximativement 48% de tumeurs primaires mammaires, et qu'elle est potentiellement un marqueur de cancer du sein métastatique, puisque son expression est élevée dans des métastases ganglionnaires (Adeyinka *et al.* 2002). Cette action combinée du Taxol et des inhibiteurs des kinases de la famille de MAPK constitue toujours une stratégie prometteuse pour le développement de nouvelles chimiothérapies.

#### III.5.2. La voie HER2

Le récepteur du facteur épidermique de croissance humain (HER2) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase codé par le protooncogène HER-2/neu (Plosker and Keam 2006). La protéine HER2 (également nommée erbB2), surexprimée dans approximativement 20 à 30% des patients atteints de cancer du sein, est cliniquement associée à l'agressivité de la tumeur et à un mauvais pronostic (Slamon *et al.* 1989; McCann *et al.* 1991). La FDA a approuvé l'utilisation du trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Genentech Inc), un anticorps humanisé anti-HER2, pour le traitement du cancer du sein métastatique surexprimant ce récepteur (Slamon *et al.* 1989). Au moins deux mécanismes ont été identifiés permettant de corréliser la surexpression de cette catégorie de récepteurs dans des lignées de

cancer du sein et la résistance au Taxol (Yu *et al.* 1998). La surexpression de HER2 augmente la transcription de p21<sup>WAF1/Cip1</sup> qui, en s'associant avec la kinase p34<sup>cdc2</sup>, inhibe l'apoptose induite par le Taxol : on a alors chimiorésistance (Yu *et al.* 1998). Ce mécanisme a d'ailleurs été observé par la suite dans des tumeurs primaires mammaires ainsi que dans la lignée cellulaire de cancer mammaire MDA-MB 435 (Tan *et al.* 2002). De même, la phosphorylation directe du résidu tyrosine 15 de Cdc2 par le domaine kinase de HER2 rend les cellules résistantes à l'apoptose induite par le Taxol et retarde l'entrée en phase M (Tan *et al.* 2002). Par ailleurs, d'autres données ont montré que la résistance accrue au Taxol, à la doxorubicine et au 5-fluorouracile pouvait être attribuée à la voie HER2/PI3K/Akt (Knuefermann *et al.* 2003). Cette étude met en évidence que la surexpression de HER2 dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 induit la phosphorylation et donc l'activation de la protéine pro-angiogénique Akt, rendant alors ces cellules moins sensibles à divers agents anti-néoplasiques. Cette chimiorésistance induite peut être réversée en transfectant les cellules avec des vecteurs d'expression dominant-négatifs de la voie PI3K/Akt (Knuefermann *et al.* 2003).

Ainsi, l'expression aberrante de protéines clés de la signalisation impliquées dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose peut également être à l'origine d'une résistance au Taxol. Actuellement, une des priorités pour le développement de nouvelles chimiothérapies dans le traitement du cancer est le contournement de ce type de résistance, en utilisant des inhibiteurs sélectifs de ces protéines kinases afin d'augmenter la sensibilité aux anticancéreux.

# MATERIELS ET METHODES



## **PARTIE I : BIOLOGIE CELLULAIRE**

### **I. CULTURE CELLULAIRE**

#### **I.1. Lignée MDA-MB 231**

La lignée cellulaire MDA-MB 231 est constituée de cellules épithéliales d'adénocarcinome mammaire humain invasif mais non-hormonodépendant (ER négative). Elle est issue d'un prélèvement d'un épanchement pleural d'une patiente atteinte d'un carcinome mammaire métastatique, suivie au M. D. Anderson Cancer Center en 1973 (Brinkley *et al.* 1980).

Cette lignée est couramment utilisée comme modèle de cancer du sein, notamment pour l'étude de la chimiorésistance aux anticancéreux, tout comme la lignée MCF-7 (ER positive). Deux sous-populations sont cultivées au laboratoire dans le cadre de ce projet, une sous-population de cellules sensibles au Taxol, que l'on appelle MDA-MB 231 Tv, et une sous-population de cellules rendues résistantes au Taxol, que l'on appelle MDA-MB 231 T8.

#### **I.2. Conditions de culture**

Les cellules sont cultivées sous hotte à flux laminaire dans des flasques TPP en plastique de 75cm<sup>2</sup> (ATGC, Marne la Vallée, France) avec 10mL de milieu complet. En fonction des expériences réalisées, les cellules sont cultivées dans des plaques de 6, 24, ou 96 puits TPP (ATGC), et peuvent également croître sur des lamelles de verre (18x18mm ou ø12mm) déposées au fond de plaques 6 ou 12 puits.

Les deux sous-populations de cellules MDA-MB 231 Tv et T8 utilisées dans cette étude sont cultivées en présence de 10µM de Vérapamil (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (ajouté extemporanément) pour bloquer en partie l'efflux du Taxol par la P-glycoprotéine. Le blocage des pompes d'efflux permet de s'affranchir de la part de résistance due à l'efflux de la drogue, permettant l'étude des autres mécanismes de résistance au Taxol mis en place par les cellules. Les cellules MDA-MB 231 T8, rendues résistantes au laboratoire à 25nM de Taxol (Sigma-Aldrich), sont cultivées en permanence avec cette concentration de Taxol.

Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère saturée en humidité, en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le niveau de confluence des cellules est vérifié quotidiennement au microscope à contraste de phase.

La composition du milieu complet est indiquée dans le Tableau V.



**Tableau V : Composition du milieu de culture**

Produit	Volume
Milieu DMEM contenant glucose 4,5g/L et Glutamax 1%	450mL
Sérum de Veau Fœtal 10%	50mL
Pyruvate de Sodium à 0,1M	5mL
L-glutamine 1%	5mL
Antibiotiques et Antimycosiques 1% contenant Pénicilline, Streptomycine et Amphotéricine B	5mL

### **I.3. Repiquage**

Les milieux de culture sont changés plusieurs fois par semaine, et l'amplification cellulaire se fait avec de la trypsine lorsque les cellules sont à environ 80% de confluence, selon le protocole suivant.

La flasque T75 est d'abord rincée avec 3mL de PBS (LONZA, Levallois-Perret, France), puis les cellules sont décollées avec 2mL de Trypsine-EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). La suspension cellulaire est ensuite diluée dans 2mL de milieu complet (pour stopper l'action de la trypsine) et centrifugée à 800g pendant 2min. Le surnageant est éliminé, et le culot cellulaire est remis en suspension avec 1mL de milieu complet. Les cellules MDA-MB 231 sont en général repiquées au quart ou au cinquième une fois par semaine (soit 1/4 ou 1/5 du culot resuspendu qui est remis en culture dans 10mL de milieu complet dans une nouvelle T75). En fonction des études réalisées et notamment dans les expériences d'immunofluorescence et des tests de cytotoxicité, il est possible d'ensemencer une quantité définie de cellules par comptage et détermination de la concentration cellulaire. Pour cela, 25µL de la suspension cellulaire est prélevée et déposée sur une cellule de comptage. Le résultat du comptage permet de déterminer la densité cellulaire de la suspension, et d'ensemencer le volume correspondant à la quantité de cellules souhaitée.

### **I.4. Congélation et Décongélation**

Afin de garantir une meilleure reproductibilité des résultats, les cellules sont congelées et décongelées régulièrement, pour réaliser les expériences sur les mêmes passages cellulaires. Le protocole de congélation des cellules est le suivant. Les cellules MDA-MB 231 sont d'abord repiquées selon le protocole décrit précédemment. Une fois le culot cellulaire remis en suspension avec 1mL de milieu complet, les cellules sont comptées sur cellule de comptage pour déterminer la concentration cellulaire. Les cellules sont ensuite réparties dans des cryotubes à la concentration de 2 millions de cellules dans 1mL de milieu de congélation. Ce dernier est composé de milieu complet auquel on ajoute 10% de SVF et 10% de DMSO (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Les cryotubes sont

ensuite déposés dans une boîte d'isopropanol placée à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au lendemain, permettant une congélation lente n'altérant pas les cellules. Le lendemain, les cryotubes sont mis dans l'azote liquide ou restent à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs mois.

Pour la décongélation, le cryotube est transféré de l'azote liquide ou du congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  immédiatement dans le bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$  pour une décongélation rapide. Le contenu du cryotube est transféré dans 10mL de milieu complet préalablement chauffé à  $37^{\circ}\text{C}$ , et centrifugé à 800g pendant 2min. Une fois le surnageant éliminé, le culot cellulaire est repris dans 1mL de milieu complet, et transféré dans une flasque T25. La T25 sera alors cultivée jusqu'à confluence des cellules, où les cellules seront repiquées et transférées dans une T75.

## II. ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE RESISTANTE AU TAXOL

Des cellules MDA-MB 231 sensibles au Taxol, appelées Tv, ont été rendues résistantes progressivement au laboratoire jusqu'à 25nM de Taxol, correspondant au 8<sup>ème</sup> palier de résistance appelé T8. Les cellules sont cultivées en présence de Vérapamil et d'une concentration de Taxol qui augmente d'un facteur 1,5 à chaque changement de palier, sachant que le milieu de culture est changé tous les 2 jours et que les cellules restent au même palier pendant 3 passages pour une meilleure adaptation à la concentration de Taxol. Le schéma d'acquisition de la résistance au Taxol par paliers est représenté dans la Figure 29. Les cellules MDA-MB 231 Tv et T8 constituent ainsi notre modèle d'étude.

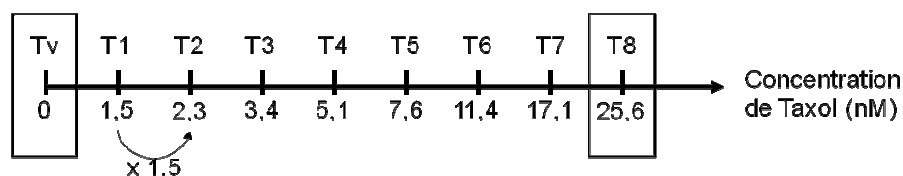


Figure 29 : Paliers de résistance au Taxol

## III. DEPOLYMERISATION DES MICROTUBULES OU DE L'ACTINE

### III.1. Dépolymérisation des microtubules par le nocodazole

Le nocodazole est une molécule qui, en se fixant sur les monomères de tubuline dépolymérisées, permet d'inhiber la repolymérisation du microtubule.

Une forte concentration de nocodazole  $10\mu\text{M}$  pendant 1h30, suivie d'une incubation sur de la glace pendant 2h, dépolymérise totalement le réseau de microtubules.

### III.2. Dépolymérisation de l'actine par la cytochalasine B

Les cytochalasines forment un groupe de métabolites fongiques, dont font partie les cytochalasine B et D (Low *et al.* 1975). La cytochalasine se lie aux extrémités barbues des filaments d'actine, ce qui inhibe à la fois l'association et la dissociation des sous-unités à cette extrémité (Cooper 1987).

De plus, les effets de la cytochalasine *in vivo* varient selon la concentration utilisée. De faibles concentrations (inférieures à 1 $\mu$ M) inhibent les ondulations membranaires ainsi que le treadmilling, alors que des concentrations supérieures (de 2 à 20 $\mu$ M) semblent nécessaires pour faire disparaître les fibres de stress (Yahara *et al.* 1982).

Pour dépolymériser les filaments d'actine, les cellules sensibles et résistantes sont donc incubées avec de la cytochalasine B à 10 $\mu$ g/mL pendant 30min.

### III.3. Repolymérisation du cytosquelette par Wash-Out

La fixation du nocodazole sur la tubuline, et de la cytochalasine sur l'actine, est réversible par simple lavage, et son élimination par lavage des cellules avec du milieu de culture froid, et remplacement par du milieu de culture chaud pendant 30min à 37°C permet la reconstruction d'un réseau interphasique normal.

## IV. TRANSFECTION

### IV.1. Transfection de plasmides à la Lipofectamine™ LTX

#### IV.1.1.Principe

Un plasmide contenant le gène codant une protéine d'intérêt est complexé avec un agent lipidique, la Lipofectamine™ LTX (Invitrogen) qui est un lipide cationique utilisé pour des cellules difficiles à transfecter. Le complexe liposome-ADN formé entre dans la cellule par endocytose, puis est transcrit dans le noyau. Dans ces conditions, l'expression de la protéine n'est que transitoire.

#### IV.1.2.Protocole opératoire

La veille de la transfection, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 100000 cellules/puits avec 2mL de milieu complet sans antibiotique. Le jour de la transfection, le plasmide est d'abord mélangé à 500 $\mu$ L/puits de milieu DMEM seul (sans sérum, ni antibiotique, ni antimycosique), auquel le Plus Reagent est ajouté à raison de 2 $\mu$ L/ $\mu$ g de plasmide. Après 5min d'incubation, la

Lipofectamine™ LTX est ajoutée au mélange à raison de 5µL/µg de plasmide. Après 30min d'incubation, le mélange est déposé sur les cellules. Le milieu de culture est changé 6h après par 2mL/puits de milieu complet avec antibiotique, pour une utilisation des cellules après 24h ou 48h. Les plasmides utilisés sont listés dans le Tableau VI.

**Tableau VI : Plasmides utilisés pour les transfections**

Plasmides	Conditions d'utilisation	Provenance
pSG5	1µg/mL transfection 24h ou 48h	Stratagene, Agilent Technologies #216201
GFP-EB1	0,4µg/mL transfection 24h	Y. Mimori-Kiyosue KAN Research Institute, Kyoto Research Park, Kyoto, Japon
GFP-Tub	1µg/mL transfection 48h	R. Tsien Department of Pharmacology, Howard Hughes Medical Center, University of San Diego, CA, USA
CFP-CCP1	1µg/mL transfection 48h	C. Janke Institut Curie, Orsay
CFP-CCP5s	1µg/mL transfection 48h	C. Janke Institut Curie, Orsay
YFP-SEPT2	1µg/mL transfection 48h	E. Spiliotis Drexel University, Philadelphia PA, USA
Cherry-SEPT2	1µg/mL transfection 48h	E. Spiliotis Drexel University, Philadelphia PA, USA
CFP-TTLL5	1µg/mL transfection 48h	C. Janke Institut Curie, Orsay
CFP-TTLL11	1µg/mL transfection 48h	C. Janke Institut Curie, Orsay

## IV.2. Transfection de siRNA au Phosphate de Calcium

### IV.2.1.Principe

Un siRNA peut être transfecté au Phosphate de calcium. Pour cela, il est mis en contact avec du chlorure de calcium dans un tampon phosphate, formant un précipité entre le siRNA et le calcium qui entre dans la cellule par endocytose. Le siRNA va alors se lier spécifiquement à une séquence de l'ARN messenger (ARNm) ciblé inhibant la traduction de la protéine codée par ces ARNm.

## IV.2.2. Protocole opératoire

La veille de la transfection, les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 100 000 cellules/puits avec 2mL de milieu complet contenant 10% d'HEPES. Le siRNA est incubé en présence de 16µL (/mL de milieu) de Tris HCl 1mM et 10µL (/mL de milieu) de CaCl<sub>2</sub> 2,5M pendant 5min, avant d'être ajouté à 100µL (/mL de milieu) de HeBS 2X. Après 30min d'incubation, le mélange est déposé sur les cellules. Le milieu de culture doit être changé 8 à 10 heures après transfection par 2mL/puits de milieu complet, avant utilisation des cellules à 48 ou 72h. Les siRNA utilisés sont listés dans le Tableau VII suivant.

**Tableau VII : siRNA utilisés pour les transfections**

siRNA	Conditions d'utilisation	Provenance
siRNA Contrôle	50nM transfection 72h	Qiagen, Courtaboeuf, France AllStars Neg. siRNA AF555 #1027286
siRNA SEPT2	100nM transfection 72h	Sigma-Aldrich, siRNA duplex (à façon) : 5'-AAGGUGAAUAUUGUGCCUGUC[dT][dT]-3'
siRNA SEPT9	100nM transfection 72h	Sigma-Aldrich, siRNA duplex (à façon) : 5'-GUCCACUUUAAUCAAUACC [dT][dT]-3'
siRNA SEPT11	100nM transfection 72h	Sigma-Aldrich, siRNA duplex (à façon) : 5'-CAAGAGGAAUUGAAGAUUAAA[dT][dT]-3'
siRNA TTLL1	100nM transfection 72h	Sigma-Aldrich #SASI_Hs01 00245872
siRNA TTL	100nM transfection 72h	Sigma-Aldrich #SASI_Hs01 00198137

## V. IMMUNOFLUORESCENCE

### V.1. Principe

L'immunofluorescence indirecte est une technique d'immunomarquage permettant de visualiser une ou plusieurs protéines dans une cellule. Après fixation des cellules préalablement cultivées sur lamelles, la protéine recherchée est marquée par un premier anticorps, appelé anticorps primaire, qui est dirigé contre l'antigène recherché. Un second anticorps, appelé anticorps secondaire, est dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire et est couplé à un fluorochrome FITC (vert), TRITC (rouge) ou Cy5 (rouge lointain) permettant la visualisation au microscope à fluorescence. Il est possible de réaliser un simple ou un multiple marquage (double ou triple) pour visualiser simultanément plusieurs protéines en utilisant des fluorochromes différents.

## V.2. Fixation

Les cellules sont préalablement cultivées en plaques 6 ou 12 puits contenant des lamelles en verre carrées de 18x18mm ou rondes de  $\phi$ 12mm. Il est possible de fixer les cellules au méthanol ou au paraformaldéhyde/saponine, en fonction des anticorps utilisés pour l'immunomarquage. La fixation permet d'immobiliser rapidement et de manière homogène les antigènes d'intérêt, pour permettre leur reconnaissance par des anticorps.

### V.2.1. Fixation au méthanol

La fixation par le méthanol permet de précipiter les antigènes protéiques par déshydratation, et également de perméabiliser les cellules en solubilisant les lipides membranaires.

Les cellules sont d'abord lavées avec un tampon PEM chaud, stabilisateur des microtubules. Elles sont ensuite fixées avec du méthanol froid (à  $-20^{\circ}\text{C}$ ) pendant 5min à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis on effectue plusieurs rinçages au PBS pour éliminer le méthanol et réhydrater les cellules, avant de réaliser l'immunomarquage. A ce stade, les cellules peuvent être conservées dans le PBS à  $4^{\circ}\text{C}$  pour réaliser le marquage ultérieurement. Pour toutes les expériences d'immunofluorescence, le PBS utilisé ne contient pas de calcium ni de magnésium.

### V.2.2. Fixation au paraformaldéhyde/saponine

La fixation par le paraformaldéhyde (PFA) permet de conserver la localisation subcellulaire par la formation de liaisons entre les protéines, mais ne perméabilise pas les cellules. La saponine perméabilise la membrane plasmique, ce qui permet aux anticorps d'entrer dans la cellule, mais pas dans le noyau étant donné que la membrane nucléaire n'est pas altérée par ce traitement.

Les cellules sont d'abord lavées avec un tampon PEM chaud, puis fixées au PFA 3,75% chaud pendant 15min à température ambiante. Après un lavage au PBS, les cellules sont incubées pendant 5min à température ambiante avec du PBS/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  5mM pour neutraliser les groupements aldéhydes. Après un nouveau lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées par du PBS/BSA 0,5% /saponine 0,05% chaud pendant 10min à température ambiante, puis on effectue plusieurs rinçages au PBS avant de réaliser l'immunomarquage. La perméabilisation à la saponine étant douce et non permanente, il est nécessaire d'incuber chaque anticorps dans la saponine. A ce stade, les cellules peuvent aussi être conservées dans le PBS à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### V.3. Immunomarquage

Les anticorps sont dilués dans du PBS/BSA 1% pour empêcher les fixations non spécifiques d'anticorps. Ils sont dilués dans du PBS/BSA 0,5% /saponine 0,05% dans le cas d'une fixation au PFA. Les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau VIII.

#### V.3.1.Simple marquage

Dans le cas d'un simple marquage, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt pendant 1h à 37°C (ou une nuit à 4°C). Après plusieurs lavages au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1h à 37°C. Cet anticorps est dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire et est couplé à un fluorochrome. Ainsi, si le premier anticorps est produit chez la souris, le second sera un anticorps anti-IgG de souris.

#### V.3.2.Marquage multiple avec des anticorps d'espèces différentes

Dans le cas d'un double ou triple marquage avec des anticorps provenant d'espèces différentes, les cellules sont d'abord incubées avec le premier anticorps primaire, dirigé contre la première protéine d'intérêt, lavées plusieurs fois au PBS, et incubées avec le premier anticorps secondaire dirigé contre l'espèce du premier anticorps primaire.

Après plusieurs lavages au PBS, les cellules peuvent directement être incubées avec le deuxième anticorps primaire, dirigé contre la deuxième protéine d'intérêt et provenant d'une espèce différente du premier, lavées au PBS, et incubées avec le deuxième anticorps secondaire, qui sera couplé à un fluorochrome différent du premier, sans risque de reconnaissance croisée du premier couple d'anticorps.

De la même manière, il est possible d'effectuer un marquage avec un troisième anticorps primaire, après plusieurs lavages au PBS, si celui-ci est produit chez une espèce différente des deux premiers. Dans ce cas, l'anticorps secondaire sera couplé à un fluorochrome différent des deux premiers.

Dans certains cas, l'ordre des marquages peut influencer sur la spécificité du résultat, un encombrement stérique pouvant empêcher la fixation des anticorps suivants. Il est donc préférable de commencer par la protéine la moins abondante.

### V.3.3. Marquage multiple avec des anticorps de même espèce

Dans le cas d'un marquage avec des anticorps provenant de la même espèce, les cellules sont d'abord incubées avec le premier anticorps primaire, dirigé contre la première protéine d'intérêt, lavées plusieurs fois au PBS, et incubées avec un anticorps secondaire Fab-FITC (1h à 37°C) dirigé contre le premier anticorps. Après plusieurs lavages au PBS, les immuns complexes doivent être à nouveau fixés au méthanol (ou au PFA), puis lavés au PBS pour réhydrater les cellules. Les cellules peuvent alors être incubées avec le deuxième anticorps primaire, lavées au PBS et incubées avec un anticorps secondaire couplé à un autre fluorochrome.

**Tableau VIII : Anticorps utilisés en immunofluorescence**

	Anticorps	Dilution	Conditions d'incubation	Espèce	Fournisseur
primaire	Anti- $\alpha$ -tubuline Clone DM1A	1/500	1h à 37°C	Souris	Sigma-Aldrich #T6139
	Anti-phalloïdine-TRITC (actine)	1/800	1h à 37°C	Amanite phalloïde	Sigma-Aldrich #P1951
	Anti-SEPT2	1/50	Une nuit à 4°C	Lapin	Atlas antibodies #HPA 018481
	Anti-SEPT9	1/200	Une nuit à 4°C	Lapin	P. Cossart Institut Pasteur, Paris
	Anti-GT335 (polyGlu-tubuline courte chaîne)	1/100	1h à 37°C	Souris	P. Denoulet UPMC, Paris
	Anti-polyE (polyGlu-tubuline longue chaîne)	1/1000	1h à 37°C	Lapin	C. Janke Institut Curie, Orsay
secondaire	Anti-souris-FITC Alexa-Fluor 488	1/300	1h à 37°C	Chèvre	Molecular Probes #A11001
	Anti-souris-TRITC Alexa-Fluor 555	1/500	1h à 37°C	Chèvre	Molecular Probes #A31621
	Anti-souris-Cy5	1/1000	1h à 37°C	Chèvre	Jackson ImmunoResearch Laboratories #115-175-164
	Anti-souris-Fab-FITC	1/50	1h à 37°C	Chèvre	Jackson ImmunoResearch Laboratories #115-097-003
	Anti-lapin-FITC Alexa-Fluor 488	1/1000	1h à 37°C	Ane	Molecular Probes #A21206
	Anti-lapin-TRITC	1/200	1h à 37°C	Ane	Sigma-Aldrich #T5268



## V.4. Montage et observation au microscope à fluorescence

Les cellules sont lavées une dernière fois au PBS, puis les lamelles sont montées sur lame en présence de milieu de montage, le Mowiol (Tableau IX), contenant un agent minimisant l'extinction de fluorescence lors de l'observation au microscope. Les lames sont conservées à 4°C au minimum pendant 1h avant d'être observées au microscope.

**Tableau IX : Composition du Mowiol**

Mowiol	
Mowiol 4-88	2,4g
Glycérol	6g
Tris 0,2M pH8	12mL
Eau distillée	6mL
DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)	0,66g

L'observation des cellules au microscope à fluorescence est réalisée pour chaque fluorochrome, selon des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques (Tableau X) qui ne doivent pas se chevaucher entre les différents fluorochromes utilisés. L'image est ensuite recomposée par superposition des différentes observations dans le cas de multiples marquages, à l'aide du logiciel de traitement d'images ImageJ.

**Tableau X : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés**

Fluorochrome	FITC	TRITC	Cy5
Longueur d'onde d'excitation	495nm	547nm	625-649nm
Longueur d'onde d'émission	519nm	572nm	670nm

## VI. CYTOMETRIE EN FLUX

### VI.1. Principe

La cytométrie en flux est une technique d'analyse multiparamétrique sur plusieurs milliers de cellules isolées, permettant de mesurer simultanément des caractéristiques physiques et biologiques de cellules marquées par un fluorochrome passant devant un faisceau laser. La taille et la granularité des cellules, ainsi que leur quantité d'ADN peuvent être mesurées par le cytomètre. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe du faisceau est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC, ou forward scatter), et celle diffractée perpendiculairement au faisceau est représentative de son contenu cytoplasmique (SSC, ou side scatter). Le cytomètre permet également de suivre la distribution des cellules dans les

différentes phases du cycle en fonction de divers stimulus ou de l'ajout de certaines drogues comme le Taxol. C'est l'analyse du contenu en ADN qui permet l'étude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire : phase G<sub>0</sub> (arrêt de prolifération), phase G<sub>1</sub> (avant réplication de l'ADN, à 2n chromosomes), phase S (synthèse ou réplication du matériel génétique, passage de 2n à 4n chromosomes), phase G<sub>2</sub> (phase à 4n chromosomes) et phase M (mitose ou division cellulaire, passage de 4n à 2n chromosomes). Les cellules en apoptose, ayant des fuites de matériel génétique dues à la perméabilisation membranaire, peuvent également être différenciées par le cytomètre (sub-G<sub>1</sub>). L'iodure de propidium, ou IP, un intercalant fluorescent des acides nucléiques, est utilisé pour marquer l'ADN de cellules préalablement perméabilisées à l'éthanol froid. L'émission de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'IP incorporé (Figure 30).

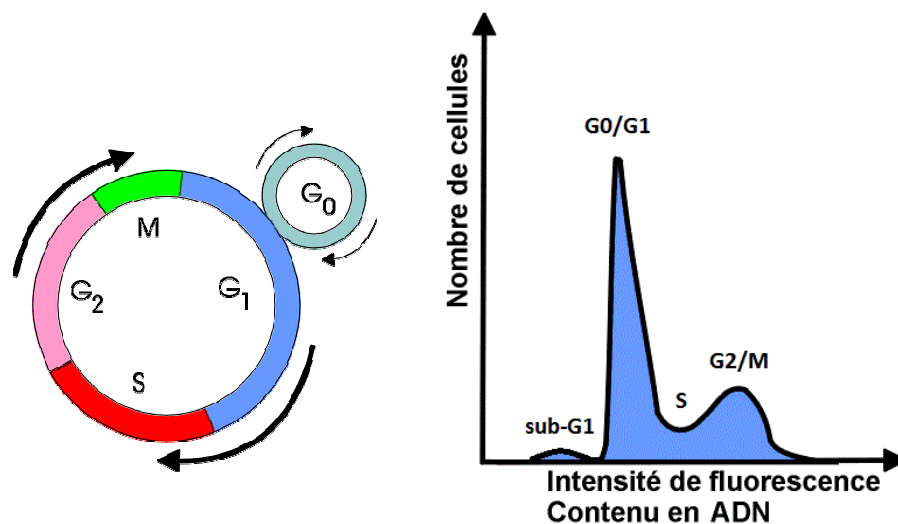


Figure 30 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

## VI.2. Protocole opératoire

A partir d'une T75 de cellules, 3 millions de cellules sont prélevées pour l'analyse en cytométrie de flux. Elles sont centrifugées pendant 3min à 800g et lavées par resuspension avec 500μL de PBS et centrifugation. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est resuspendu avec 1mL d'éthanol 75% froid (-20°C) et conservées pendant une nuit à -20°C. Les cellules sont ensuite lavées avec 500μL de PBS comme précédemment, et le culot cellulaire est resuspendu avec 500μL d'IP 50μg/mL dans du PBS. Les cellules sont bien homogénéisées et incubées pendant 1h à température ambiante à l'obscurité, puis centrifugées pendant 3min à 800g, et le culot est resuspendu dans 500μL de PBS pour analyse au cytomètre de flux (BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, BD Biosciences) avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

## VII.MESURE DES VITESSES DE CROISSANCE DES MICROTUBULES *IN VIVO*

### VII.1.Microscopie *in vivo*

Des séquences d'images sont acquises au microscope à fluorescence afin d'observer la trajectoire des extrémités en croissance des microtubules (comètes) dans des cellules vivantes Tv et T8 transfectées avec la protéine de bout (+) EB1-GFP, ce qui est comparable mais plus aisément analysable qu'avec la tubuline fluorescence (Matov *et al.* 2010).

### VII.2.Kymographes

Les vitesses de croissance des microtubules sont mesurées grâce à la réalisation de kymographes à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband W., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). L'obtention d'un kymographe se fait par l'utilisation d'un module additionnel d'ImageJ (<http://www.embl.de/eamnet/html/kymograph.html>). Après superposition des images d'un film, les trajectoires des comètes observées sont tracées manuellement. Ces trajectoires sont ensuite utilisées par le logiciel qui projette les intensités lumineuses de fluorescence sur leur chemin et restitue alors un graphique représentant la distance de l'objet parcouru en fonction de la durée du film (Figure 31).

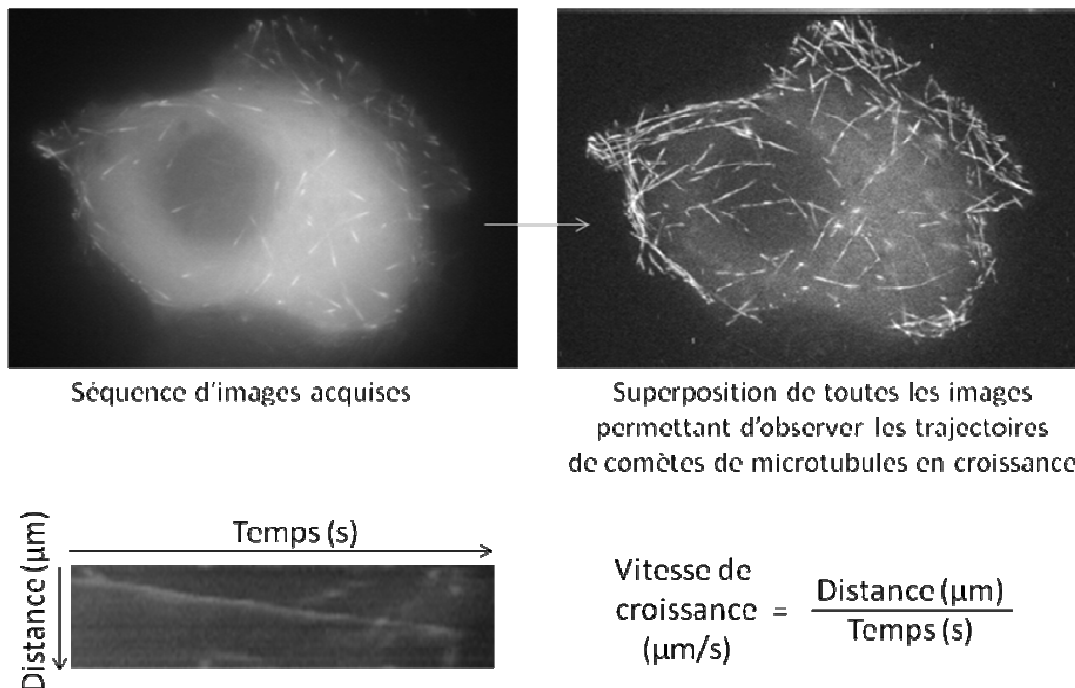


Figure 31 : Construction de kymographes

## PARTIE II : BIOCHIMIE

### I. EXTRACTIONS

#### I.1. Principe

Le protocole d'extraction des microtubules a été développé au sein du laboratoire, et permet d'isoler le cytosol et les microtubules totaux, mais aussi les microtubules dynamiques et stables (Phung-Koskas *et al.* 2005).

Pour une extraction de microtubules totaux, les cellules sontensemencées dans des flasques T75 dont le fond a été préalablement recouvert de gélatine 0,02%, afin d'augmenter leur adhérence au support de culture. L'extraction est réalisée lorsque les cellules atteignent 85% de confluence.

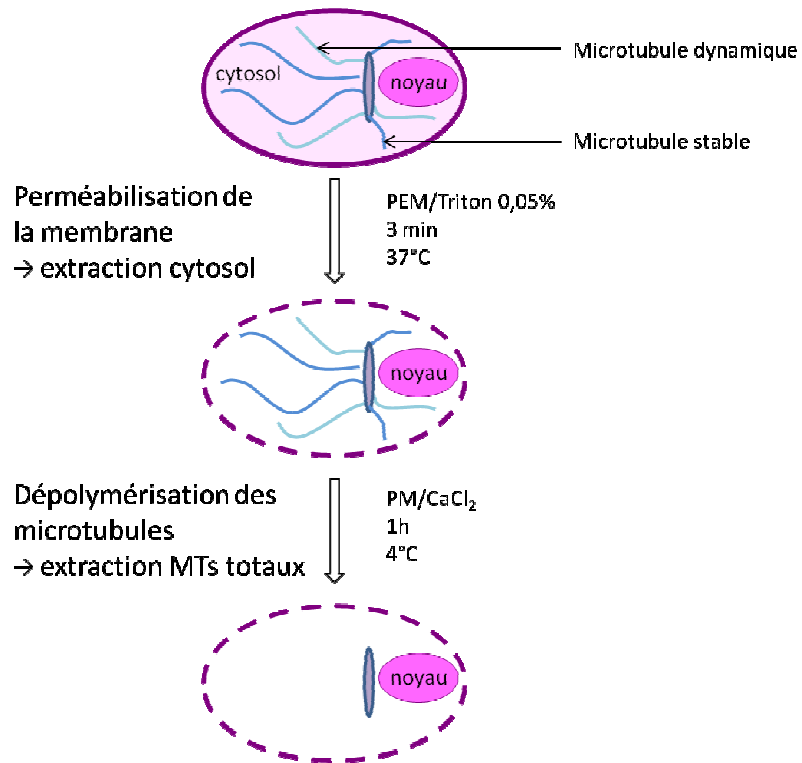


Figure 32 : Extraction cytosol et microtubules totaux

## I.2. Réactifs

Le tampon PEM est un tampon stabilisateur de microtubules. Il est utilisé pour les lavages et entre dans la composition de la solution de perméabilisation, où les microtubules doivent rester intacts.

Pour les solutions de perméabilisation de la membrane et de dépolymérisation des microtubules (Tableau XI), les inhibiteurs de protéases et de phosphatases sont ajoutés extemporanément.

**Tableau XI : Composition des tampons de perméabilisation et de dépolymérisation**

Tampon PEM pH6,9		
PIPES		80mM
EGTA		2mM
MgCl <sub>2</sub>		1mM
Tampon PM pH6,9		
PIPES		80mM
MgCl <sub>2</sub>		1mM
Solution de perméabilisation : PEM/Triton 0,05% (pour 10mL)		
Tampon PEM		9,85mL
Triton X-100 à 10%		50μL
Inhibiteurs de protéases	PMSF 0,2M	50μL
	Benzamidine 0,2M	50μL
	Leupeptine 0,2M	50μL
Inhibiteurs de phosphatases	NaF 0,1M	10μL
	Ortho-vanadate 0,1M	10μL
Solution de dépolymérisation : PM/CaCl <sub>2</sub> (pour 10mL)		
Tampon PM		9,4mL
CaCl <sub>2</sub>		500μL
Inhibiteurs de protéases	PMSF 0,2M	50μL
	Benzamidine 0,2M	50μL
	Leupeptine 0,2M	50μL
Inhibiteurs de phosphatases	NaF 0,1M	10μL
	Ortho-vanadate 0,1M	10μL

## I.3. Extraction du cytosol

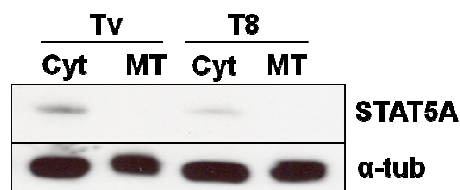
Les cellules sont d'abord lavées deux fois avec du tampon PEM préalablement chauffé à 37°C pour stabiliser les microtubules. Leur membrane plasmique est ensuite perméabilisée pendant 3min à 37°C par le Triton à 0,05% contenu dans la solution de perméabilisation préalablement chauffée à 37°C, permettant de récupérer la fraction cytosolique, et les cellules sont délicatement lavées au PEM pour éliminer l'excès de Triton. Les protéines solubles, dont la tubuline soluble, sont ainsi extraites dans la fraction cytosolique (Figure 32).

#### I.4. Extraction des microtubules totaux

Les microtubules totaux (dynamiques et stables sans distinction) sont ensuite dépolymérisés pendant 1h sur la glace par l'action conjointe du froid et du calcium contenu dans la solution de dépolymérisation préalablement placée à 4°C, permettant de récupérer la fraction microtubulaire.

Les fractions extraites (cytosol et microtubules totaux) sont centrifugées à 3 000g à 4°C pendant 20min, puis concentrées à 3 000g à 4°C avec des unités de filtration VivaSpin de 4 ou 20mL (Sartorius-Stedim, Göttingen, Allemagne) jusqu'au volume souhaité. Les protéines des échantillons sont dosées, puis ces derniers sont conservés à -20°C avant utilisation (Figure 32).

Par ailleurs, la qualité de l'extraction des microtubules a été validée par l'absence de contamination des fractions microtubulaires par des protéines solubles cytosoliques. STAT5A, un facteur de signalisation et de transcription qui a été démontré au laboratoire comme étant une protéine exclusivement cytosolique (Phung-Koskas *et al.* 2005; Geeraert *et al.* 2010), est bien absente de nos fractions microtubulaires (Figure 33).



**Figure 33 : Vérification de la qualité de l'extraction des microtubules totaux**

Analyse par Western blot du niveau d'expression de STAT5A, utilisé comme marqueur de contamination cytosolique, et d' $\alpha$ -tubuline, dans les fractions cytosoliques (cyt) et microtubulaires (MT) Tv et T8, l' $\alpha$ -tubuline étant ici utilisée comme marqueur de charge protéique

#### I.5. Lysats cellulaires totaux

Pour lyser les cellules, celles-ci sont d'abord lavées au PBS et sont décollées par 2mL de trypsine-EDTA pendant 3min à 37°C. Elles sont transférées dans un tube contenant 2mL de milieu et centrifugées à 800g pendant 2min. Le culot est lavé par resuspension dans du PBS et centrifugé de nouveau à 800g pendant 2min. Le culot est ensuite repris dans 200 $\mu$ L de tampon de lyse (Tableau XII), contenant du Tris 10mM pH8, du Triton X-100 à 0,1% et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Après 30min d'incubation dans la glace, le lysat est centrifugé pendant 20min à 10 000g à 4°C, et le surnageant obtenu est transféré dans un tube propre. Les protéines des échantillons sont dosées, puis ces derniers sont conservés à -20°C avant utilisation.

**Tableau XII : Composition du tampon de lyse**

Tampon de lyse : Tris/Triton 0,1%		pour 1mL
Tris-base 10mM, pH8		985µL
Triton X-100 à 10%		10µL
Inhibiteurs de protéases	PMSF 0,2M	5µL
	Benzamidine 0,2M	5µL
	Leupeptine 0,2M	5µL
Inhibiteurs de phosphatases	NaF 0,1M	1µL
	Ortho-vanadate 0,1M	1µL

## II. DOSAGE DES PROTEINES

### II.1. Principe

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA), qui est dérivée de celle du Biuret, mais qui est plus sensible. Le BCA Assay Protein Quantitation Kit (Interchim, Montluçon, France) est utilisé sur une plaque 96 puits.

Les ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  sont réduits par les protéines en ions cuivreux  $\text{Cu}^{3+}$ , qui forment avec le BCA un complexe coloré en pourpre absorbant à 562nm. L'intensité de la coloration (absorbance) est alors directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon, que l'on détermine par lecture sur une courbe d'étalonnage réalisée avec une gamme étalon de BSA réalisée entre 0 et 2mg/mL.

### II.2. Protocole opératoire

La gamme d'étalonnage est d'abord préparée à partir d'une solution d'albumine à 2mg/mL fournie avec le kit. 10µL de chaque étalon sont déposés en duplicat sur une plaque 96 puits, avec les échantillons à doser dilués au 1/2 et au 1/4, également en duplicat. 200µL de solution de coloration sont ajoutés. Celle-ci est préparée extemporanément en mélangeant 1 volume de réactif B contenant le  $\text{CuSO}_4$  à 50 volumes de réactif A contenant le BCA. La réaction colorimétrique se produit après incubation pendant 30min à 37°C à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 562nm au spectrophotomètre, permettant de calculer la concentration protéique des échantillons sur un fichier Excel.

### III. TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE ET DE CYTOTOXICITE

#### III.1. Gamme de Taxol

Plusieurs tests de cytotoxicité nous permettent de déterminer de différentes manières l'IC<sub>50</sub> de Taxol des cellules Tv et T8 traitées par une gamme de concentration croissante de Taxol, de 0 à 500nM (Tableau XIII), mettant ainsi en évidence la chimiorésistance des cellules T8. Les tests sont réalisés sur des plaques 24 puits, avec 3 puits pour chaque concentration.

Les cellules sontensemencées à raison de 20 000 cellules/puits pour les cellules Tv et 20 000 cellules/puits pour les cellules T8 sur plaques 24 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées selon la gamme de Taxol ci-dessous.

Tableau XIII : Gamme de Taxol

Concentration de Taxol par puits (nM)	500	100	60	40	25	10	5	0
---------------------------------------	-----	-----	----	----	----	----	---	---

#### III.2. Dosage à la SulfoRhodamine B

##### III.2.1.Principe

Le dosage à la Sulforhodamine B (SRB) est un test de cytotoxicité basé sur la coloration de protéines cellulaires par la sulforhodamine B (Skehan *et al.* 1990). La SRB se lie par interactions électrostatiques aux résidus basiques des protéines des cellules toujours présentes au fond des puits après traitement par la gamme de Taxol, les cellules étant fixées à l'acide trichloracétique (TCA).

##### III.2.2.Protocole opératoire

Les cellules sont lavées deux fois avec 300µL/puits de PBS, puis fixées avec 100µL/puits de TCA 10% pendant 1h à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées cinq fois avec 300µL/puits d'eau distillée avant d'être marquées avec 150µL/puits de solution de SRB 0,4% dans de l'acide acétique 1% pendant 20min à température ambiante. Les cellules sont de nouveau lavées cinq fois avec 300µL/puits d'acide acétique 1% afin d'éliminer l'excès de coloration de SRB, avant d'être solubilisées avec 300µL/puits de Tris HCl 10mM. Après agitation forte pendant 1h minimum, l'absorbance est mesurée à 560nm au spectrophotomètre, permettant de déterminer l'IC<sub>50</sub> des cellules Tv et T8, à l'aide du logiciel Prism4 (GraphPad software), et donc la cytotoxicité du Taxol.



### **III.3. Test MTT**

#### **III.3.1.Principe**

Le test MTT est un test de viabilité cellulaire, basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate-déshydrogénase. En présence du substrat MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium), qui est un colorant d'inclusion, les sels de tétrazolium du substrat, de coloration jaune, sont réduits en cristaux insolubles de formazan, de couleur violette, grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. La concentration de formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 560 nm, permettant de déterminer la quantité de cellules vivantes après traitement par la gamme de Taxol.

#### **III.3.2.Protocole opératoire**

Les cellules sont incubées avec 100µL/puits d'un mélange MTT 0,5mg/mL dans du milieu DMEM pendant 2h à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Après un lavage au PBS, les cristaux de formazan formés sont dissous avec 200µL/puits de DMSO pendant 5min à 37°C, et l'absorbance est mesurée à 560nm au spectrophotomètre, permettant de déterminer l'IC<sub>50</sub> des cellules Tv et T8, à l'aide du logiciel Prism4, et donc là encore la cytotoxicité du Taxol.

## **IV. WESTERN BLOT**

### **IV.1. Principe**

Le Western Blot est une technique permettant de détecter et d'identifier des protéines spécifiques dans un échantillon. Les protéines des échantillons préparés sont séparées selon leur masse moléculaire apparente par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées du gel sur une membrane de PVDF (fluorure de polyvinylidène). Les sites d'interaction non spécifiques de la membrane sont ensuite saturés avant de réaliser l'immunomarquage avec des anticorps spécifiques de la protéine à détecter. La révélation des protéines d'intérêt se fait alors par chimioluminescence, les anticorps secondaires étant couplés à la peroxydase.

## IV.2. Préparation des échantillons

Les échantillons (lysats cellulaires, cytosol et microtubules totaux congelés à -20°C) doivent être dénaturés et chargés négativement pour pouvoir être séparés uniquement selon leur masse moléculaire. Pour cela, ils sont repris dans un volume adéquat de tampon échantillon concentré 4X (Tableau XIV), contenant du SDS pour charger négativement les protéines, du  $\beta$ -mercaptoéthanol pour rompre les ponts disulfures, du bleu de bromophénol pour permettre de suivre visuellement la migration et du glycérol pour alourdir l'échantillon. Les échantillons sont encore dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 min avant d'être déposés dans les puits du gel d'électrophorèse.

**Tableau XIV : Composition du tampon échantillon concentré 4X**

Tampon échantillon 4X	
Tris-HCl 2,5M pH6,8	0,5mL
$\beta$ -mercaptoéthanol	0,5mL
SDS 20%	2mL
Glycérol 100%	2mL
Bleu de bromophénol	Quelques grains

## IV.3. SDS-PAGE

### IV.3.1. Réactifs

**Tableau XV : Composition des tampons utilisés pour le SDS-PAGE**

Tampon de séparation Tris-base 1,8M pH8,8	
Tris base	21,8g
H <sub>2</sub> O milliQ	qsp 100mL
HCl 10N	qsp pH8,8
Tampon de compression Tris-HCl 0,625M pH6,8	
Tris base	7,56g
H <sub>2</sub> O milliQ	qsp 100mL
HCl 6N	qsp pH6,8
Tampon de migration/transfert 10X	
Tris base	30g
Glycine	130g
H <sub>2</sub> O milliQ	qsp 1L
Tampon de migration 1X	
Tampon de migration/transfert 10X	100mL
SDS 20%	5mL
H <sub>2</sub> O milliQ	qsp 1L

**Tableau XVI : Composition des gels utilisés pour le SDS-PAGE**

1 gel de séparation à 9%	
Bisacryl 40% acryl/bisacrylamide (29/1)	2,25mL
Tampon de séparation	2mL
SDS 20%	50µL
H <sub>2</sub> O milliQ	5,7mL
Persulfate d'ammonium 100mg/mL	37,5mL
TEMED	12,5mL
1 gel de compression à 4,5%	
Bisacryl 40% acryl/bisacrylamide (29/1)	0,5mL
Tampon de compression	1mL
SDS 20%	7,5µL
H <sub>2</sub> O milliQ	3,5mL
Persulfate d'ammonium 100mg/mL	50µL
TEMED	10µL

### IV.3.2. Protocole opératoire

La méthode du SDS-PAGE est adaptée de celle décrite par Laemmli (Laemmli 1970). Un gel de séparation de 7 à 15% est coulé, 9% permettant de séparer des protéines de masse moléculaire moyenne, comme l' $\alpha$ -tubuline à 55kDa. Un gel de compression à 4,5% est coulé au-dessus, et permet d'aligner les échantillons déposés sur un même front de migration. Un marqueur de poids moléculaire (PM Page Ruler, Euromedex) est déposé avec les échantillons. La migration est réalisée en minicuve (MiniProtean II, BioRad, Hercules, CA, USA) à 110V (voltage constant) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

## IV.4. Electrotransfert

### IV.4.1. Réactifs

**Tableau XVII : Composition du tampon utilisé pour l'électrotransfert**

Tampon de transfert 1X	
Tampon de migration/transfert 10X	100mL
Ethanol	200mL
H <sub>2</sub> O milliQ	700mL

#### IV.4.2. Protocole opératoire

Les protéines séparées par SDS-PAGE selon leur masse moléculaire doivent être transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare, Vélizy, France) préalablement activée pendant 30sec dans de l'éthanol pur, pour rendre les protéines accessibles aux anticorps (Towbin *et al.* 1979). Le transfert est réalisé par une méthode appelée « en sandwich » sous l'influence d'un champ électrique pendant 2h à 110V dans la glace (ou une nuit à 40V à 4°C).

### IV.5. Immunomarquage

#### IV.5.1. Réactifs

Tableau XVIII : Composition des tampons utilisés pour l'immunomarquage

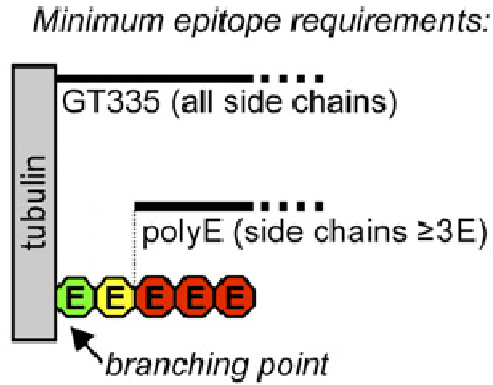
Tampon TBS 10X pH7,5 (à utiliser 1X)	
Tris-base	24,2g
NaCl	87,66g
H <sub>2</sub> O milliQ	qsp 1L
HCl 10N	qsp pH7,5
Tampon TTBS	
Tampon TBS 10X	100mL
Tween 20	2mL
H <sub>2</sub> O milliQ	qsp 1L
Solution de saturation à 10%	
Lait écrémé	5g
Tampon TTBS	50mL

**Tableau XIX : Anticorps utilisés en Western Blot**

Anticorps	Dilution	Conditions d'incubation	Espèce	Fournisseur et référence
Anti- $\alpha$ -tubuline clone DM1A	1/5000	1h à température ambiante	Souris	Sigma-Aldrich # T6199
Anti- $\beta$ -tubuline I	1/20000	2h à température ambiante	Souris	Sigma-Aldrich # T7816
Anti- $\beta$ -tubuline III	1/400	1h à température ambiante	Souris	Sigma-Aldrich # T8660
Anti- $\beta$ -tubuline IV	1/400	1h à température ambiante	Souris	Sigma-Aldrich # T7941
Anti- $\beta$ -tubuline V	1/500	2h à température ambiante	Lapin	Abcam #ab82368
Anti- $\alpha$ -acétyl-tubuline	1/1000	1h à température ambiante	Souris	Sigma-Aldrich #T6793
Anti-glu-tubuline	1/1000	Une nuit à 4°C + 1h à température ambiante	Lapin	AbCys #AbC63-3590
Anti-tyr-tubuline clone YL1/2	1/1000	1h à température ambiante	Rat	L. Lafanechère INSERM/ UJF823, Grenoble
Anti- $\Delta$ 2-tubuline	1/1000	Une nuit à 4°C + 1h à température ambiante	Lapin	L. Lafanechère INSERM/ UJF823, Grenoble
Anti-polyE (polyGlu-tubuline longue chaîne)	1/2000	Une nuit à 4°C + 1h à température ambiante	Lapin	C. Janke Institut Curie, Orsay
Anti-GT335 (polyGlu-tubuline Courte chaîne)	1/5000	2h à température ambiante	Souris	P. Denoulet UPMC, Paris
Anti-actine HRP	1/10000	1h à température ambiante	Souris	Santa Cruz Biotechnologies #Sc-47778
Anti-SEPT2	1/1000	1h à température ambiante	Lapin	Atlas antibodies #HPA 018481
Anti-SEPT8	1/500	1h à température ambiante	Chèvre	Santa Cruz Biotechnologies #N-15 Sc-48937
Anti-SEPT9	1/100	Une nuit à 4°C + 1h à température ambiante	Lapin	Santa Cruz Biotechnologies #C-25 Sc-130263
Anti-SEPT9 (_v1-4)	1/2000	1h à température ambiante	Lapin	P. Cossart Institut Curie, Paris
Anti-SEPT11	1/500	Une nuit à 4°C + 1h à température ambiante	Lapin	Atlas antibodies #HPA 003459

	Anti-KHC	1/200	Une nuit à 4°C + 2h à température ambiante	Chèvre	Santa Cruz Biotechnologies #N-15 Sc-13356
	Anti-dynéine chaîne intermédiaire	1/1000	2h à température ambiante	Souris	Pierce antibodies #MA1-070
	Anti-CLIP-170	1/100	1h à température ambiante	Lapin	Santa Cruz Biotechnologies #H-300 Sc-25613
	Anti-MCAK Clone 1G2	1/1000	2h à température ambiante	Souris	Abnova #H00011004-M01
	Anti-MAP4	1/500	1h à température ambiante	Souris	BD Biosciences #611027
	Anti-survivine	1/500	1h à température ambiante	Souris	Santa Cruz Biotechnologies #D-8 Sc-17779
	Anti-P53	1/250	1h à température ambiante	Souris	Santa Cruz Biotechnologies #DO-1 Sc-126
	Anti-STAT5A	1/1000	1h à température ambiante	Lapin	Santa Cruz Biotechnologies #L-20 Sc-1081
secondaire	Anti-souris HRP	1/10000	1h à température ambiante	Cheval	Cell Signaling #7076
	Anti-lapin HRP	1/7500	1h à température ambiante	Mouton	Cell Signaling #7074
	Anti-chèvre HRP	1/5000	1h à température ambiante	Ane	Santa Cruz Biotechnologies #Sc-2020
	Anti-rat HRP	1/10000	1h à température ambiante	Chèvre	Thermo Scientific #31476

Nous disposons de deux anticorps reconnaissant spécifiquement les chaînes latérales polyglutamylées de la tubuline. L'anticorps GT335 reconnaît spécifiquement les branchements de résidus glutamate quelle que soit la longueur de la chaîne polyglutamylée générée, alors que l'anticorps polyE reconnaît les longues chaînes latérales, à partir de 3 résidus glutamate branchés latéralement (Figure 34).



**Figure 34 : Deux anticorps reconnaissant spécifiquement la polyglutamylation de la tubuline selon la longueur de la chaîne latérale**

(modifié d'après van Dijk *et al.* 2007)

#### IV.5.2. Protocole opératoire

Les protéines ayant été transférées sur la membrane de PVDF, elles peuvent être détectées par des anticorps spécifiques. Mais afin d'éviter une adsorption non spécifique des anticorps sur la membrane, il est nécessaire de saturer les sites non spécifiques avec une solution de saturation contenant 10% de lait écrémé, pendant 1h à température ambiante (la saturation se fait par les protéines du lait).

La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire spécifique dirigé contre une protéine d'intérêt (dilué dans une solution de TTBS avec 5% de lait). Les conditions d'incubation dépendent de l'anticorps, et peuvent varier entre 1h à température ambiante et une nuit à 4°C. Après trois lavages de 5min au TTBS, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase reconnaissant l'espèce de l'anticorps primaire (également dilué dans une solution de TTBS avec 5% de lait). Après trois lavages au TTBS et un dernier lavage au TBS 1X, la révélation est réalisée par chimioluminescence avec le réactif ECL (Pierce, Thermo scientific, Courtaboeuf, France). La peroxydase va oxyder le substrat dérivé du luminol ajouté sur la membrane, émettant des photons qui vont impressionner un film photographique (Amersham HyperFilm ECL, GE Healthcare) lors de la mise en contact avec la membrane sous lumière inactinique. Le temps d'exposition du film dépend de l'intensité du signal émis.

## **PARTIE III : BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **I. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL**

#### **I.1. Extraction d'ARN totaux**

Les cellules Tv et T8 sont préalablement cultivées dans des boîtes de ø 6cm. A confluence, après deux lavages au PBS sur de la glace, les cellules sont récupérées par grattage avec du PBS stérile froid. Après centrifugation à 10 000g pendant 5min à 4°C, le culot cellulaire est resuspendu avec 500µL de réactif phénol-guanidine (Extractall, Eurobio, Courtaboeuf, France) pour 2 boîtes de ø 6cm. Puis sont ajoutés 200µL de chloroforme ultrapur froid (-20°C) et après incubation pendant 15min dans la glace, en agitant toutes les 5min pour favoriser la séparation des phases, une centrifugation à 10 000g pendant 15min à 4°C permet de récupérer les ARN totaux dans la phase supérieure aqueuse. Celle-ci est ensuite additionnée de 250µL d'isopropanol pur, puis conservée toute une nuit à -20°C afin de précipiter les ARN. Ces derniers sont récupérés après centrifugation à 10 000g pendant 30min à 4°C. Après lavage avec de l'éthanol à 70% glacé puis centrifugation, le culot est séché et repris dans 25µL d'eau ultra-pure additionnée de 0,3µL de RNase Out. Les ARN totaux ainsi obtenus sont dilués au 1/100<sup>ème</sup> et leur absorbance est lue au spectrophotomètre à 260nm puis utilisés immédiatement ou conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### **I.2. Contrôle qualité des ARN totaux**

Le contrôle qualité des ARN est d'abord estimé par le calcul du rapport des absorbances à 260 et 280nm qui doit être compris entre 1,7 et 2 puis plus précisément par électrophorèse miniaturisée sur puce avec le RNA 6000 labChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les échantillons d'ARN, déposés dans différents puits de la puce, migrent dans des microcanaux pour finalement être injectés dans le canal de séparation. Les différentes molécules présentes dans les échantillons sont alors séparées par électrophorèse et détectées par fluorescence. Les résultats apparaissent sous forme d'une image de gel et d'un électrophorégramme (non présenté ici).



### **I.3. Synthèse du 1<sup>er</sup> brin d'ADN complémentaire : Reverse Transcription**

#### **I.3.1.Principe**

Cette réaction est catalysée par une reverse transcriptase qui est une ADN polymérase ARN dépendante capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc), à l'aide de désoxyribonucléotides.

#### **I.3.2.Protocole opératoire**

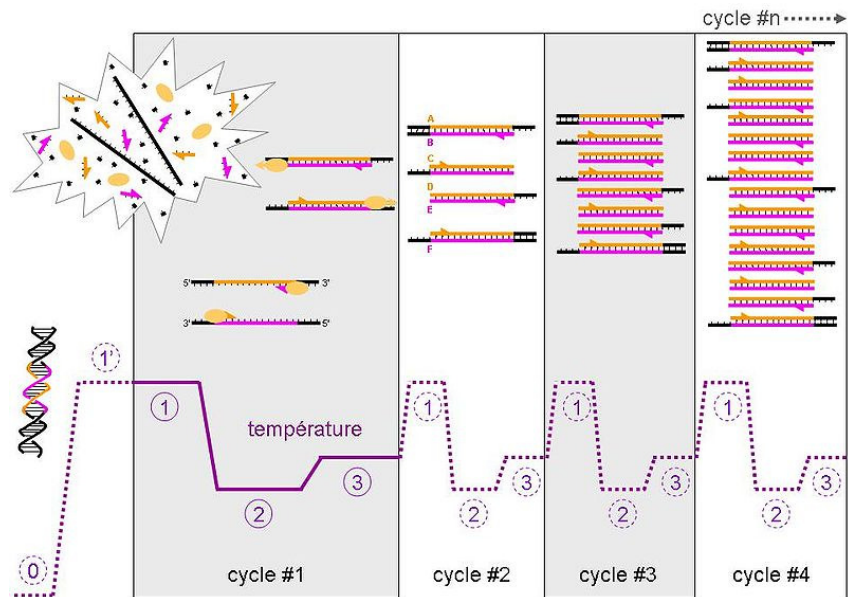
La synthèse du premier brin d'ADNc est effectuée dans un volume final de 20µL à partir de 2µg d'ARN préalablement dénaturés en présence de 0,5µL d'hexamères aléatoires, 4µL de dNTPs à 2,5mM pendant 5min à 65°C au bain marie puis refroidi immédiatement dans la glace. La réaction de PCR est effectuée après ajout de 4µL de tampon 5X, 1µL de DTT 0,1µM, 1µL de RNase Out, des ARN dénaturés et 1µL de reverse transcriptase SuperscriptIII. Après incubation à 25°C pendant 5min puis à 50°C pendant 50min, les enzymes sont inactivées pendant 15min à 70°C. L'ADNc est conservé à -20°C jusqu'à utilisation pour la PCR.

### **I.4. Amplification par PCR quantitative en temps réel**

#### **I.4.1.Principe**

La PCR permet d'amplifier *in vitro* une séquence d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et étudier son expression. Il est ainsi possible de quantifier et de comparer les transcrits de cellules Tv et T8. Pour cela, une série de trois réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée de façon cyclique (sur environ 30 cycles) (Figure 35). Les trois phases constituant un cycle de PCR sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :

- la phase de dénaturation, à 95°C, permet de dissocier complètement les deux brins d'ADN
- la phase d'hybridation, qui s'effectue à une température définie par la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C), permet l'hybridation des amorces sens et antisens à l'ADN matrice
- la phase d'élongation, à 72°C (température optimale pour l'ADN polymérase), permet la synthèse des brins complémentaires d'ADN à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées avec les dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.



**Figure 35 : Premiers cycles d'une PCR**

#### I.4.2.Choix des amorces

Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel en ligne Primer designing tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) de sorte à avoir un pourcentage de GC d'environ 50% et des températures d'hybridation ( $T_m \sim 60^\circ\text{C}$ ) similaires au sein de chaque couple d'amorces, sens et antisens. L'absence de formation de dimères (hybridation d'une amorce sur l'autre) est également un critère pris en compte. La spécificité des amorces a été vérifiée avec BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### I.4.3.Protocole opératoire

Les réactions d'amplification sont réalisées avec un thermocycleur CFX96 (BioRad). Le système de détection des produits formés est l'agent intercalant SYBR<sup>®</sup> Green.

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 10 $\mu\text{L}$ , comprenant 4 $\mu\text{L}$  d'une solution diluée de matrice d'ADNc et 6 $\mu\text{L}$  d'un mélange constitué du réactif de PCR 1X (SSOFast Eva Green<sup>®</sup>) et des amorces spécifiques de chaque gène à la concentration finale de 0,5 $\mu\text{M}$ . Le programme thermique inclut, pour tous les gènes étudiés, une activation de 30sec à 95 $^\circ\text{C}$  suivie de 45 cycles comprenant une dénaturation de 2sec à 95 $^\circ\text{C}$  et une hybridation/élongation de 5sec à 60 $^\circ\text{C}$ . Au cours de la synthèse du produit, le SYBR Green se lie à la molécule d'ADN double brin et devient alors fluorescent.

#### I.4.4. Analyse des résultats

L'intensité de fluorescence due à l'incorporation de l'intercalant dans l'ADN double brin, proportionnelle à la quantité d'ADN formé, est mesurée par l'appareil à chaque cycle d'élongation. Les résultats de la PCR sont exprimés en valeur de Ct (« cycle threshold » ou cycle seuil) qui correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil de détection du fluorimètre. Le Ct est inversement proportionnel au logarithme du nombre de copies  $N_0$  du transcrit présent dans l'échantillon d'ARN de départ, d'après la loi de la PCR :  $N = N_0 (1+E)^n$ ,  $n$  étant le nombre de cycles et  $N$  le nombre de copies présent au cycle  $n$ . L'efficacité  $E$  de la PCR de chaque couple d'amorces est déterminée à l'aide d'une gamme de dilutions de la matrice d'ADNc, c'est le taux de doublement des molécules d'ADN. Une PCR de performance acceptable est caractérisée par une efficacité comprise entre 90 et 100%. Les gènes de normalisation ont été choisis pour leur stabilité d'expression dans les cellules MDA-MB 231 en utilisant le logiciel geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) qui est un outil de sélection des gènes les plus stables dans un système biologique donné.

Les résultats obtenus sont exprimés en expression relative. Le calcul du rapport (Rn) est effectué par la différence des Ct (« méthode du  $\Delta\Delta Ct$  »), avec normalisation sur trois gènes de référence (GAPDH, 18S et TBP-H2), à l'aide de l'équation suivante :

$$Rn = \frac{(1 + E)_{\text{cible}}^{-[\Delta Ct_{\text{cible}}]}}{(1 + E)_{\text{REF}}^{-[\Delta Ct_{\text{REF}}]}}$$

où  $\Delta Ct = Ct_{\text{échantillon x}} - Ct_{\text{échantillon témoin}}$  et le  $Ct_{\text{REF}}$  est la moyenne géométrique des Ct mesurés pour chacun des 3 gènes de référence.

## PARTIE IV : PROTEOMIQUE

### I. PREPARATION DES ECHANTILLONS

#### I.1. Réactifs

Tableau XX : Composition du tampon de solubilisation des échantillons

Tampon de solubilisation urée/thiourée	
Urée	7M
Thiourée	2M
CHAPS	3%
Nonidet P-40	1%
H <sub>2</sub> O milliQ	

#### I.2. Protocole opératoire

Seuls les microtubules totaux (extraction décrite précédemment) ont été analysés en protéomique. Après concentration et dosage des protéines, les extraits microtubulaires totaux sont dessalés sur colonne Tris BioSpin (Bio-Rad) puis précipités avec 1mL d'acétone glacée (-20°C) pendant une nuit à -20°C, et les échantillons sont centrifugés à 10 000g à 4°C pendant 20min. Après élimination du surnageant (contenant l'acétone), le culot sec est conservé à -80°C. Le culot de fraction microtubulaire est ensuite solubilisé avec 400µL de tampon de solubilisation urée/thiourée, avant d'être utilisé en électrophorèse bidimensionnelle.

## II. ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

### II.1. Principe

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est une technique permettant de séparer des mélanges de protéines en conditions dénaturantes (O'Farrell 1975). Le principe de la séparation repose sur la combinaison d'une isoélectrofocalisation (IEF), en première dimension suivie d'une migration sur gel SDS-PAGE en deuxième dimension. L'IEF est une méthode hautement résolutive qui permet de séparer les protéines sur un gradient de pH immobilisé (IPG) (Bjellqvist *et al.* 1982) en fonction de leur point isoélectrique (pHi ou pI). Les protéines migrent et se focalisent par précipitation dans la zone de pH où leur charge électrique est nulle, ce qui correspond à leur pI. Une étape d'équilibration est ensuite nécessaire pour permettre de charger les protéines négativement afin de ne pas altérer la migration de la deuxième dimension, en plus d'une réduction au dithiothréitol (DTT) et d'une

alkylation à l'iodoacétamide. La seconde dimension en SDS-PAGE permet alors la migration des protéines selon leur masse moléculaire apparente.

La résolution séparative accrue des polypeptides obtenue sur les gels 2D (Gorg *et al.* 2000) constitue l'atout majeur de cette technique, permettant de visualiser simultanément plusieurs centaines, voire milliers, de protéines, afin d'étudier les protéomes d'extraits totaux de tissus, cellules, ou de bactéries, et d'en identifier tous les composants, soit dans une optique d'inventaire (cartographie protéique), soit pour réaliser une analyse différentielle.

## II.2. Première Dimension : IEF

### II.2.1.Réactifs

Tableau XXI : Composition de la solution de solubilisation

Solution de solubilisation	
Echantillon (dans tampon de solubilisation urée/thiourée)	350µL
DTT 1%	7µL
Ampholytes : IPG buffer 0,5%	1,75µL
Bleu de bromophénol	Quelques grains

### II.2.2.Protocole opératoire

100 ou 200µg d'extraits de microtubules totaux Tv ou T8 sont prélevés et complétés à 350µL de solution de solubilisation (Tableau XXI) pour être déposés dans un sarcophage de 18cm (possibilité d'utiliser six sarcophages, donc six échantillons, en parallèle). Une « strip » (bandelette de gel de polyacrylamide à 4%) de pH3-11, pH4-7 ou pH3-5,6 (Immobilin Dry Strip, GE Healthcare), est ensuite déposée côté gel contre l'échantillon, et 400µL d'huile minérale est ajoutée à la surface de la strip pour éviter sa déshydratation. Deux petits morceaux de buvard hydratés, permettant de dessaler davantage les échantillons, sont ajoutés entre le gel et les électrodes avant de lancer le programme de focalisation correspondant à la gamme de pH choisie sur l'Ettan IPGPhorII (GE Healthcare) (Tableau XXII). Après l'étape de focalisation, les strips peuvent être conservées à -20°C avant d'effectuer la seconde dimension.

**Tableau XXII : Programmes d'IEF**

Programme IEF	pH3-11 Non Linéaire	pH4-7 Linéaire	pH3-5,6 Non Linéaire
Réhydratation passive	7h à 20°C	7h à 20°C	7h à 20°C
Focalisation	Step 8h à 50V	Step 9h à 50V	Step 4h à 50V
	Step 1h à 500V	Step 1h à 200V	Step 2h à 300V
	Step 1h à 1000V	Grad 1000V à 600V.h	Grad 1000V à 3000V.h
	Step 5h à 8000V	Grad 8000V à 18000V.h	Grad 8000V à 20000V.h
		Step 3h30 à 8000V	Step 4h à 8000V

### II.3. Etape d'équilibration : Réduction et Alkylation

#### II.3.1.Réactifs

**Tableau XXIII : Composition du tampon d'équilibration**

Tampon d'équilibration	
Tris 1,5M/HCl pH8,8	50mM
Urée	6M
Glycérol	30%
SDS	2%
Bleu de bromophénol	Quelques grains
H <sub>2</sub> O milliQ	

#### II.3.2.Protocole opératoire

Après lavage à l'eau distillée, les strips focalisées sont déposées dans les rainures d'un plateau avec 2,5mL de tampon d'équilibration additionné de 325µL de DTT 1% pour l'étape de réduction, sous agitation lente pendant 15 minutes.

Après lavage à l'eau distillée, les strips sont transférées dans d'autres rainures du plateau avec 2,5mL de tampon d'équilibration additionné cette fois de 125mg d'iodoacétamide pour l'étape d'alkylation, sous agitation lente pendant 15 minutes.

Avant la deuxième dimension, les strips peuvent être conservées dans du tampon d'électrophorèse avec du bleu de bromophénol.

## II.4. Deuxième Dimension : SDS-PAGE

### II.4.1. Réactifs

Tableau XXIV : Composition du gel de deuxième dimension

Gel SDS-PAGE 12%	2 gels	6 gels
Acrylamide/bisacrylamide à 30% (37,5/1)	80mL	180mL
Tris 1,5M/HCl pH8,8	50mL	112mL
H <sub>2</sub> O milliQ	66mL	148mL
Dégazer pendant 10 min sous agitation		
SDS 10%	2mL	4,5mL
APS 10%	2mL	4,5mL
TEMED	80μL	180μL

Tableau XXV : Composition du tampon d'électrophorèse

Tampon d'électrophorèse	1X
Tris	25mM
Glycine	192mM
SDS	0,1%
H <sub>2</sub> O milliQ	

### II.4.2. Protocole opératoire

Six gels de dimension 200x260x1mm (Tableau XXIV) peuvent être coulés simultanément dans une cassette Ettan DALT6 Gel Caster (GE Healthcare). Ces six gels peuvent migrer simultanément dans une cuve Ettan DALT6 Separation Unit (GE Healthcare).

Les strips sont déposées contre chaque gel (en haut), avec un marqueur de poids moléculaire déposé sur un petit morceau de buvard du côté acide de la strip (côté +), et sont recouvertes d'agarose chaud en attendant la mise sous tension du système. Les gels sont déposés dans la cuve inférieure, qui est remplie de tampon électrophorèse 1X (Tableau XXV). La cuve supérieure est placée et remplie de tampon électrophorèse 2X. La migration se fait ensuite en trois étapes (Tableau XXVI).

Tableau XXVI : Programme de migration de la deuxième dimension

	Temps	Voltage	Ampérage	Puissance
1 <sup>ère</sup> étape : passage de la strip au gel	30 min	80V	10mA/gel	1W/gel
2 <sup>ème</sup> étape : migration lente	30 min	160V	20mA/gel	2W/gel
3 <sup>ème</sup> étape : fin de migration	4h45	600V	400mA	17W/gel

## II.5. Coloration des gels

### II.5.1. Coloration au Bleu de Coomassie

Après démoulage, les gels sont lavés avec de l'eau milliQ trois fois 5min sous agitation. Les protéines sont ensuite fixées pendant 1h dans un mélange éthanol 30% /acide acétique 5%. Après 15min de lavage à l'eau milliQ, les gels sont colorés au Bleu de Coomassie (EZblue, Sigma-Aldrich) pendant une nuit à 4°C sous agitation lente, et enfin lavés plusieurs fois à l'eau milliQ jusqu'à élimination du bruit de fond. Les gels sont numérisés à l'aide du scanner ImageScannerII (GE Healthcare) et du logiciel LabScan (GE Healthcare).

### II.5.2. Coloration au SyproRuby

Après démoulage, les gels sont lavés avec de l'eau milliQ trois fois 5min sous agitation. Les protéines sont ensuite fixées pendant deux fois 30 min dans un mélange éthanol 50% /acide acétique 7%. Les gels sont ensuite colorés au SyproRuby (Bio-Rad), colorant fluorescent, dilué au 1/3 pendant une nuit sous agitation lente à l'abri de la lumière, et enfin lavés pendant 30min dans un mélange éthanol 10% /acide acétique 7% sous agitation lente à l'abri de la lumière pour enlever le surplus de colorant, puis de nouveau lavés pendant 10min puis deux fois 5min à l'eau milliQ sous agitation à l'abri de la lumière. Les gels sont numérisés à l'aide du scanner Typhoon<sup>TM</sup> 9400 Variable Mode imager (GE Healthcare) et du logiciel ImageQuant (GE Healthcare).

## III. SPECTROMETRIE DE MASSE

### III.1. Principe

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) (Lahm and Langen 2000). Un spectromètre de masse (MS) est composé de quatre parties (Figure 36) :

- un système d'introduction de l'échantillon, l'échantillon pouvant être introduit sous forme solide, liquide ou gazeuse
- une source d'ionisation, pouvant être une électronebulisation (électrospray, ou ESI) ou un MALDI (désorption-ionisation laser assistée par matrice)



- un analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ), permettant de mesurer la masse exacte des analytes, comme le temps de vol (TOF) ou la trappe ionique, avec la possibilité de coupler plusieurs analyseurs en tandem (MS/MS)

- un détecteur et un système de traitement, transformant les ions en signal électrique analysable par informatique avec représentation des données avec un spectre de masse.

Afin d'être étudiés en spectrométrie de masse, les spots d'intérêt doivent être piqués sur les gels puis digérés pour en extraire les protéines à identifier.

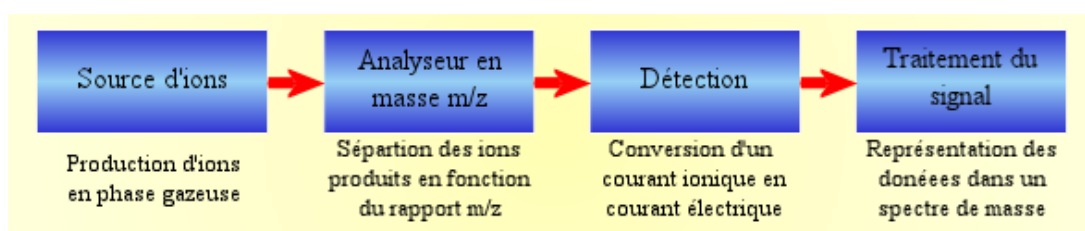


Figure 36 : Structure d'un spectromètre de masse

## III.2. Digestion enzymatique des spots issus des gels 2D

### III.2.1.Réactifs

Tableau XXVII : Composition de la solution d'extraction

Solution d'extraction	
Acétonitrile	60%
Acide formique	5%
H <sub>2</sub> O milliQ	

### III.2.2.Protocole opératoire

Les spots d'intérêt sont d'abord excisés, manuellement ou à l'aide de l'Ettan SpotPicker (GE Healthcare) et placés dans une plaque 96 puits dans de l'eau milliQ, d'où les protéines seront extraites par digestion des protéines « in gel » (Tableau XXVII).

Après élimination de l'eau dans les puits, les spots d'intérêt sont incubés pendant 10min sous agitation avec 100µL d'acétonitrile (ACN). Après élimination du surnageant, ils sont hydratés avec 100µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM pendant 5min sous agitation, puis à nouveau incubés avec 120µL d'ACN pendant 15min sous agitation pour expulser l'eau et les sels dissous du spot. Ce lavage par hydratation au NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM et incubation avec l'ACN est renouvelé une deuxième fois. Après élimination du surnageant, les spots sont incubés avec 100µL d'ACN 100% jusqu'à leur complète déshydratation.

Les spots sont ensuite incubés avec 40µL de DTT 10mM pendant 45min à 56°C pour la réduction des protéines, puis ramenés à température ambiante pour éliminer le surnageant. Après ajout de 60µL d'ACN sur les spots, le surnageant est immédiatement éliminé. Les spots sont ensuite incubés avec 40µL d'iodoacétamide 55mM pendant 30min sous agitation à l'obscurité pour l'alkylation des protéines. Le surnageant est éliminé après décantation. Les spots sont de nouveau lavés par hydratation au NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM et incubation avec de l'ACN. Après élimination du surnageant, les spots sont incubés avec 100µL d'ACN 100% jusqu'à leur complète déshydratation.

Les spots sont incubés avec 10µL de solution de trypsine à 12ng/µL dans NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM pour la digestion des protéines, d'abord pendant 1h sur la glace pour réhydrater les spots, puis une nuit à 37°C pour la digestion enzymatique. La trypsine hydrolyse la liaison peptidique après les acides aminés lysine et arginine. Le lendemain, les spots peuvent être conservés à -20°C ou les protéines peuvent être extraites directement pour l'analyse, soit en MALDI-TOF soit en nanoLC-MS/MS.

La digestion tryptique est arrêtée par un mélange d'acétonitrile /acide trifluoroacétique (ACN 50% /TFA 1%), puis le digestat contenu dans les puits est transféré dans un nouvelle plaque 96 puits. 5µL de solution d'extraction sont ajoutés dans la plaque de digestion pour extraire un maximum de peptides par incubation pendant 1h avant un transfert dans la nouvelle plaque.

### III.3. MALDI-TOF

#### III.3.1.Principe

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, ou Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, ou time-of-flight).

L'échantillon protéique est cocrystallisé avec une matrice sur une surface métallique appelée cible, puis bombardé par un laser. La matrice, souvent l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) est utilisée pour protéger l'échantillon de la destruction par le faisceau laser et pour faciliter la vaporisation et l'ionisation. Les peptides désorbés et ionisés (le plus souvent en ions monochargés) sont analysés par un analyseur en temps de vol, qui consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée (Figure 37). Ainsi, les ions de rapport m/z le plus petit parviendront au détecteur les premiers.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est la plus largement utilisée pour l'identification des protéines par « empreinte peptidique massique » (peptide mass fingerprint). L'identification des protéines nécessite ensuite une analyse bioinformatique reposant sur l'interrogation de banques de données comme SwissProt ou NCBI, et l'utilisation de logiciels nécessaires à leur exploitation comme Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

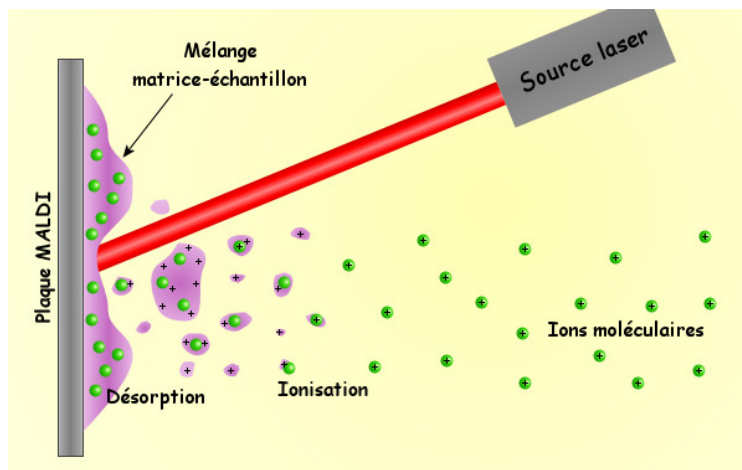


Figure 37 : Source d'ionisation MALDI

### III.3.2. Protocole opératoire

Les dépôts sur la cible MALDI (100 dépôts maximum par cible) sont réalisés selon la méthode de la goutte sèche. 0,7µL d'un mélange composé de 0,3µL de standard de calibration et de 0,4µL de matrice CHCA (diluée au 1/3) est déposé en haut à droite de chaque dépôt d'échantillon sur la cible MALDI, puis 0,7µL d'échantillon, recouvert par 0,8µL de matrice CHCA sont déposés sur la cible. Les échantillons sont dessalés par ajout d'1µL d'acide formique 2%, immédiatement chassé avec une poche à vide.

Les spectres MALDI-TOF des peptides sont acquis, avec l'aide de Christophe Marchand à l'IBBMC à Orsay, avec un spectromètre de masse Voyager-DE STR (Perseptive Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) équipé d'un laser azote de 337nm, en mode réflectron positif. Le logiciel Data Explorer (Perseptive Applied Biosystems) est utilisé pour l'analyse des spectres, les pics d'autolyse de la trypsine étant utilisés comme standards de calibration externe. Mascot Peptide Mass Fingerprint est utilisé pour l'interrogation de banques de données, avec les données listées dans le Tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Données fixées pour Mascot Peptide Mass Fingerprint

Mascot Peptide Mass Fingerprint	
Database	SwissProt
Taxonomie	Homo sapiens
Enzyme	trypsine
Erreurs de clivage autorisées	1
Modifications fixes	Carbamidomethyl C
Modifications variables	Oxydation M
Tolérance de peptide	±100ppm
Valeurs de masse	MH <sup>+</sup>
Charge	Monoisotopique

## III.4. LC-MS/MS

### III.4.1.Principe

Les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines sont séparés par chromatographie liquide (LC) en phase inverse suivant leur hydrophobicité, couplée à une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En mode électrospray (ESI), l'échantillon protéique en solution est pulvérisé en fines gouttelettes par action d'un champ électrique intense. Les peptides ionisés (comportant des ions multichargés) sont analysés dans un spectromètre de masse, permettant de mesurer la masse des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines (MS simple) et de fragmenter ces mêmes peptides (spectres MS/MS) pour accéder à la structure de ces derniers. La MS/MS consiste à sélectionner un ion parent par une première MS, à le fragmenter par collision, puis à effectuer une deuxième spectrométrie de masse sur les ions fils générés. La trappe ionique est constituée de plusieurs analyseurs et permet de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement, sur la base d'un mouvement périodique des ions dans un champ magnétique ou électrodynamique (Figure 38).

Les spectres obtenus sont analysés en bioinformatique avec interrogation de banques de données, de la même manière que le MALDI-TOF.

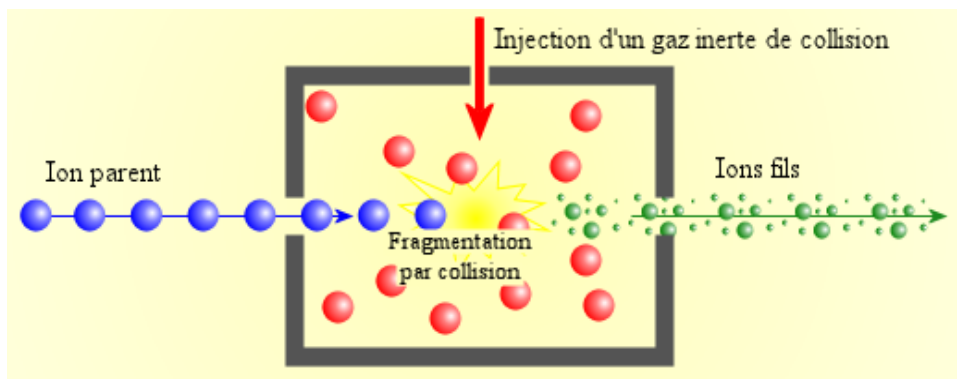


Figure 38 : Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

### III.4.2.Protocole opératoire

La plaque 96 puits contenant les peptides extraits est directement positionnée dans le système d'introduction. Les peptides sont injectés à 4 $\mu$ L/min dans une pré-colonne puis à 200nL/min dans une nano-colonne sous un voltage de -1900V (Agilent 1200 Series capillary LC system, Agilent Technologies), où ils seront élués vers la trappe ionique (6330 Ion Trap, Agilent Technologies) équipé d'une source d'ionisation nanospray Chip Cube (Agilent Technologies). Les différentes étapes, et notamment le passage de MS à MS/MS, sont contrôlées par les logiciels de la trappe ionique. Le

logiciel Data Analysis (PerseptiveApplied Biosystems) est utilisé pour l'analyse des spectres, et Mascot MS/MS Ion Search est utilisé pour l'interrogation de banques de données, avec les données listées dans le Tableau XXIX.

**Tableau XXIX : Données fixées pour Mascot MS/MS Ion Search**

Mascot MS/MS Ion Search	
Database	SwissProt
Taxonomie	Homo sapiens
Enzyme	trypsine
Erreurs de clivage autorisées	1
Modifications fixes	Carbamidomethyl C
Modifications variables	Oxydation M
Tolérance en peptide	±100ppm
Tolérance en MS/MS	±0,5Da
Valeurs de masse	MH <sup>+</sup>
Charge	1+, 2+ et 3+, Monoisotopique
Decoy	Taux de faux positif

## IV. ANALYSE D'IMAGE

### IV.1. Principe

L'analyse d'images repose sur la numérisation de l'image du gel 2D après coloration. Chaque pixel de l'image est enregistré à une position x et y associée à une valeur d'absorbance proportionnelle à l'intensité du signal enregistré par le scanner. Les logiciels d'analyses d'images tels que ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare) incorporent des éléments de visualisation 3D des spots du gel, permettant des changements d'angles en x, y, et z utilisés pour séparer des spots proches.

L'analyse d'image permet ainsi, par superposition des images de gels, de comparer les profils protéomiques de différents échantillons pour en évaluer des variations qualitatives (présence ou absence d'une protéine sur un des gels) et quantitatives (enrichissement protéique sur un des gels). Une analyse différentielle fiable nécessite d'établir une comparaison entre des séries de trois gels au minimum.

## IV.2. Analyse d'image avec ImageMaster 2D Platinum

Après numérisation des gels, les spots sont détectés automatiquement par le logiciel ImageMaster 2D Platinum. Les gels sont ensuite alignés par superposition de plusieurs spots communs à l'ensemble des gels. La détection automatique nécessite un nettoyage minutieux des gels par suppression des spots correspondant à une impureté visible sur le gel et non à une protéine, et modification de la forme de certains spots (augmentation ou diminution de la taille du spot, fusion de deux spots ou séparation de spots chevauchants).

Après avoir défini les différentes classes d'échantillons (classes Tv et T8), et choisi un gel référent dans chaque classe, les gels sont d'abord comparés par classe au gel référent. Par superposition des gels deux à deux, les spots sont appariés automatiquement par un vecteur, puis l'appariement est vérifié pour chaque spot. De plus, l'intensité des spots des gels d'une même classe est normalisée par rapport à leur référent (coefficient de corrélation  $r^2$  proche de 1).

Les classes sont ensuite comparées entre elles (gels Tv comparés aux gels T8), par comparaison des médianes des intensités des spots des deux classes, en choisissant « mean=0% » (correspondant à la médiane) et « mean absolute deviation=100% » (déviations standard moins affectées par les valeurs extrêmes), et sélection des spots à déviations standard non chevauchantes (Gap>0).

Un test statistique de Kolmogorov-Smirnov est appliqué à ces spots sélectionnés. Les spots significatifs sont ceux dont le score de Kolmogorov-Smirnov est supérieur au seuil fixé par le nombre de gels de l'étude. Seuls les spots significatifs sont sélectionnés (Gap>0 et Kolmogorov>seuil).

Par comparaison uniquement des médianes des intensités des spots des deux classes, en choisissant « mean=0% » (médiane) et « mean absolute deviation=0% » (permettant de faire le ratio des médianes sans tenir compte de la déviation standard), seuls les spots dont le ratio est supérieur à 2 sont sélectionnés (Gap>0, Kolmogorov>seuil et ratio>2). Cela correspond à un enrichissement protéique de 100% dans un sens ou dans l'autre, ce qui permet d'avoir une puissance statistique de 80% pour un nombre de gels donné (Karp and Lilley 2007).

Ces spots sélectionnés sont enfin vérifiés manuellement une dernière fois sur chaque gel pour valider le différentiel obtenu.



# RESULTATS ET DISCUSSION





Ce projet de thèse repose sur l'exploration des variations protéiques de l'environnement des microtubules dans le but d'étudier les mécanismes cellulaires à l'origine de la chimiorésistance au Taxol de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231.

Bien que le travail effectué s'articule en deux majeures parties : une étude protéomique suivie d'une étude fonctionnelle, la description des résultats a été scindée en cinq parties, chacune insistant sur un point particulier.

La première partie présente le protocole d'établissement de la lignée cancéreuse résistante au Taxol, et décrit l'étude du recrutement de certaines protéines ou isotypes sur les microtubules des cellules résistantes déjà connus dans la littérature pour contrer l'effet du Taxol.

La deuxième partie rapporte l'analyse protéomique comparative (cellules sensibles versus cellules résistantes) réalisée dans l'objectif d'identifier des protéines de l'environnement des microtubules qui pourraient intervenir dans la mise en place du phénotype chimiorésistant. Cette partie du travail reprend les résultats que nous avons publiés récemment dans la revue *Proteomics*.

La troisième partie s'intéresse ensuite plus particulièrement aux septines, dont plusieurs ont été retrouvées différemment exprimées et enrichies dans la fraction microtubulaire des cellules résistantes. Nous mettons ici en évidence l'implication de ces septines dans la chimiorésistance.

La quatrième partie s'articule autour des modulations d'accumulation sur la tubuline de certaines modifications post-traductionnelles, comme notamment la tyrosination et la polyglutamylation, que nous retrouvons en plus grande quantité sur les microtubules des cellules résistantes. Un lien est établi avec le recrutement accru des septines sur les microtubules des cellules résistantes, ainsi que leur impact sur le mécanisme d'acquisition de la résistance au Taxol.

Enfin, la cinquième et dernière partie s'intéresse à la dynamique microtubulaire des cellules sensibles et résistantes, notamment en étudiant le recrutement sur les microtubules de certaines protéines déjà décrites dans la littérature pour être, soit impliquées dans la régulation de la dynamique microtubulaire, soit recrutées différemment en fonction du degré d'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline.

La compilation des résultats nous permet de proposer, dans la discussion générale, un mécanisme hypothétique de résistance au Taxol des cellules cancéreuses MDA-MB 231, où le recrutement accru des septines sur les microtubules, en relation avec l'augmentation de la polyglutamylation et de la tyrosination de la tubuline, occasionnerait le recrutement de protéines favorisant une certaine récupération de la dynamique microtubulaire.



# **PARTIE I : ÉTABLISSEMENT D'UNE LIGNÉE MDA-MB-231 RESISTANTE AU TAXOL**

## **I. MODELE DE RESISTANCE CHRONIQUE AU TAXOL**

### **I.1. Choix de la stratégie d'une résistance chronique au Taxol**

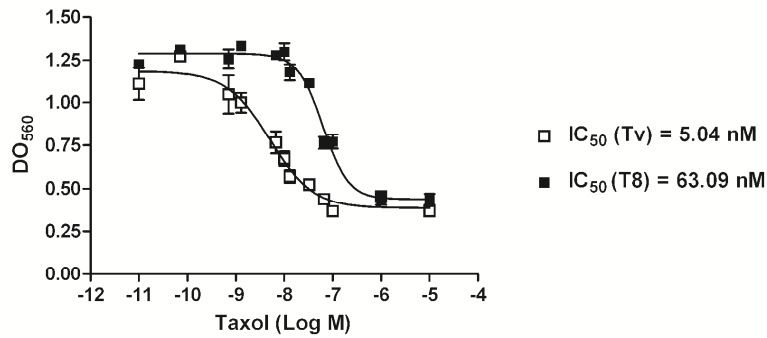
Dans l'objectif d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de l'acquisition d'une résistance au Taxol en relation avec le cytosquelette de microtubules, nous avons décidé de créer une lignée cellulaire résistante au Taxol de façon chronique, lente et progressive. La lignée cellulaire choisie est une lignée épithéliale d'adénocarcinome mammaire humain invasif non-hormonodépendant (ER négative), la lignée MDA-MB 231.

Notre modèle d'étude a été établi par augmentation progressive de la concentration de Taxol, jusqu'à 25nM, qui correspond au 8<sup>ème</sup> palier de résistance, appelé T8 (voir Matériel et Méthodes). Ainsi, les cellules MDA-MB T8 sont cultivées en permanence en présence de 25nM de Taxol.

Le choix d'une acquisition lente d'une résistance par franchissement de paliers de faible amplitude assure que la surexpression de transporteurs d'efflux reste un mécanisme mineur de résistance et devrait permettre l'étude des régulations de la dynamique des microtubules mises en jeu pour compenser les effets stabilisateurs du Taxol. Néanmoins, nous avons choisi de cultiver les cellules (aussi bien les cellules non traitées, sensibles, que les résistantes) en permanence en présence de 10µM de Vérapamil, un inhibiteur de la pompe d'efflux P-glycoprotéine, afin de s'affranchir de la part d'efflux due à ce transporteur. De ce fait, les cellules sensibles au Taxol, servant de témoin à notre étude, ont été appelées MDA-MB 231 Tv.

### **I.2. Cytotoxicité du Taxol**

Un test de cytotoxicité a été réalisé avec des concentrations croissantes de Taxol afin de caractériser le niveau de résistance au Taxol des cellules MDA-MB Tv et T8. L'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) du Taxol des cellules Tv est ainsi de 5nM, alors qu'elle atteint 63nM pour les cellules T8, soit 12,6 fois plus que dans les cellules sensibles (Figure 39). Ces résultats confirment l'acquisition d'un phénotype résistant au Taxol.

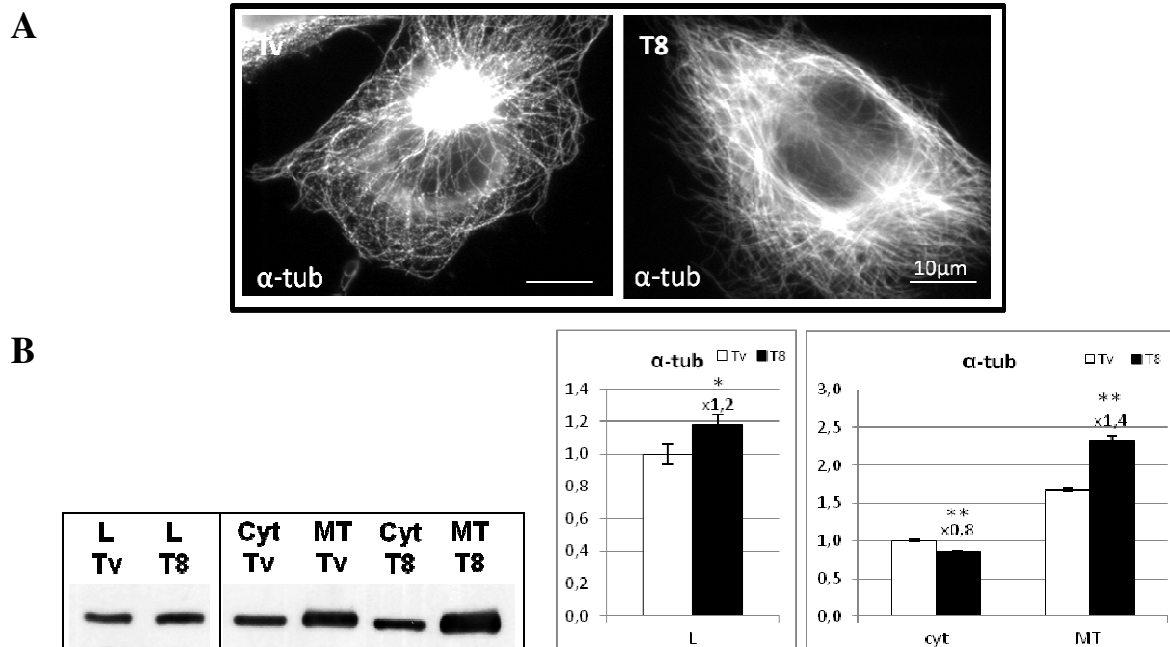


**Figure 39 : Cytotoxicité comparée du Taxol dans les cellules MDA-MB Tv et T8**

Test de cytotoxicité à la Sulforhodamine B, réalisé après 48h d'exposition à des concentrations croissantes de Taxol. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  écart-type de quatre mesures.

## II. SUREXPRESSION ET INCORPORATION DE NOUVEAUX ISOTYPES DE TUBULINE DANS LES MICROTUBULES

L'observation des cellules sensibles Tv et résistantes T8 après marquage en immunofluorescence de l' $\alpha$ -tubuline met en évidence une plus grande quantité de microtubules dans les cellules résistantes (Figure 40 A). Pour une même quantité de protéines totales, les cellules T8, cultivées en permanence en présence de Taxol, montrent une augmentation de la masse de polymère de tubuline (fraction microtubulaire) au détriment de la tubuline soluble (fraction cytosolique) (Figure 40 B), due à l'effet stabilisateur du Taxol.

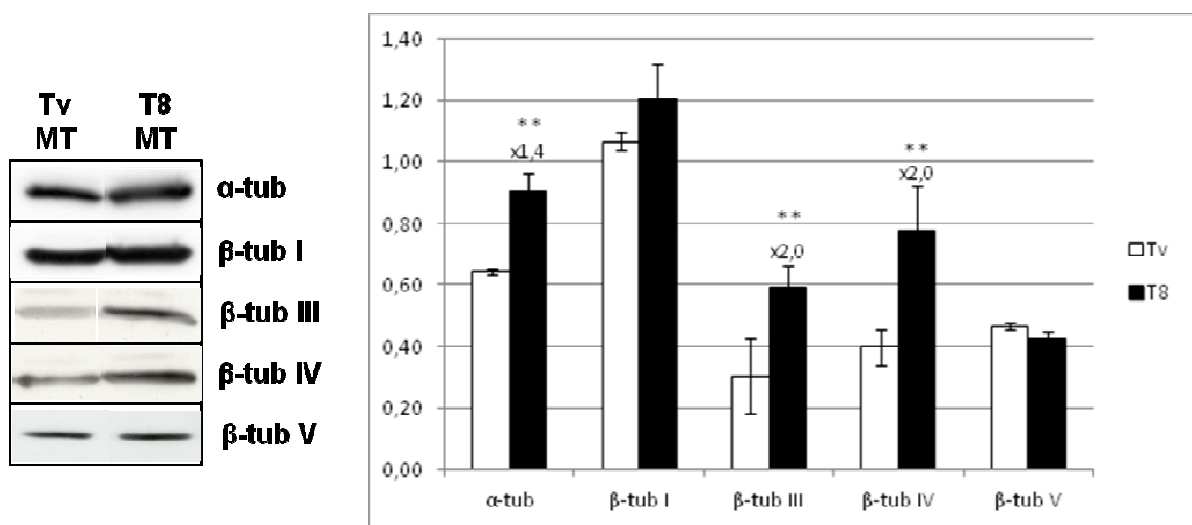


**Figure 40 : Augmentation de la quantité de tubuline polymérisée dans les cellules résistantes au Taxol**

**A** : Marquage en immunofluorescence d' $\alpha$ -tubuline dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8, **B** : Analyse par Western blot du niveau d'expression d' $\alpha$ -tubuline dans les lysats et les fractions cytosoliques (Cyt) et microtubulaires (MT) Tv et T8 (à gauche) avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes (à droite). Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \* et \*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ .

Cette augmentation de la quantité de tubuline polymérisée dans les cellules résistantes peut être quantifiée ( $\times 1,4$ ) dans un immunoblot d'extraits microtubulaires de cellules Tv et T8 en utilisant un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline (Figure 40 et Figure 41). En raison de cet effet stabilisateur du Taxol, il est important de noter, dès à présent, que tous les immunoblots voués à étudier le niveau d'accumulation de certaines protéines d'intérêt seront réalisés à quantité de tubuline égale dans toute la suite de notre étude.

Par ailleurs, l'incorporation de certains isotypes de  $\beta$ -tubuline étant très souvent observée dans des lignées cellulaires résistantes au Taxol, nous avons vérifié leur modulation d'expression dans des extraits de microtubules totaux de cellules sensibles Tv et résistantes au Taxol (palier T8) (Figure 41). L'expression de  $\beta$ I-tubuline, un isotype ubiquitaire de  $\beta$ -tubuline, ne varie pas au cours de l'acquisition de la résistance au Taxol, tout comme celle de l'isotype  $\beta$ V, qui reste faiblement exprimé. En revanche, nos résultats montrent que le niveau d'expression des isotypes de  $\beta$ III- et  $\beta$ IV-tubuline, augmente dans les fractions microtubulaires du palier T8 de résistance au Taxol des cellules MDA-MB 231.



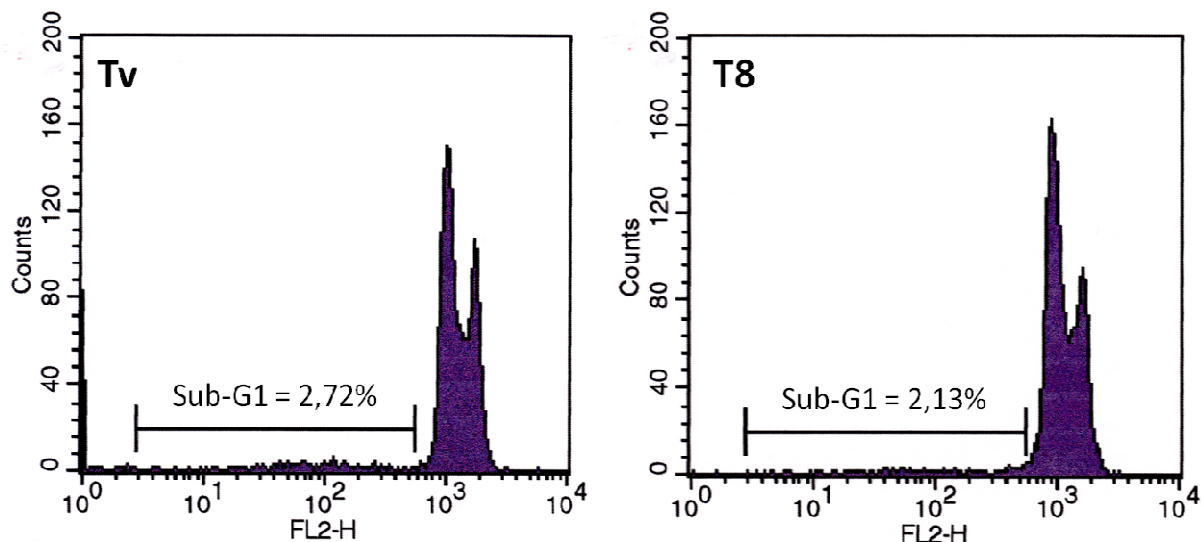
**Figure 41 : Surexpression des isotypes III et IV de  $\beta$ -tubuline dans les fractions microtubulaires de cellules MDA-MB 231 résistantes au Taxol**

Analyse par Western blot du niveau d'expression d' $\alpha$ -tubuline et des isotypes I, III, IV et V de  $\beta$ -tubuline dans les fractions microtubulaires Tv et T8 (à gauche) avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes (à droite). Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*\* correspond à  $p < 0,01$ .

### III. ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES DE L' APOPTOSE

#### III.1. Analyse du cycle cellulaire des cellules sensibles et résistantes par cytométrie en flux

En se liant à la  $\beta$ -tubuline, le Taxol stabilise les microtubules, ce qui induit un arrêt de la mitose et conduit les cellules vers l'apoptose. Afin de déterminer si les cellules résistantes au Taxol induisent moins l'apoptose que les cellules sensibles, une analyse par cytométrie en flux a permis de quantifier les différentes phases du cycle cellulaire des cellules sensibles et résistantes, notamment le pic sub-G1 caractéristique de cellules hypoploïdes (apoptotiques ou nécrotiques). D'après la quantification des pics sub-G1, il semble que seulement 2,72% des cellules Tv et 2,13% des cellules T8 soient hypoploïdes (Figure 42). Ces taux de cellules potentiellement en apoptose étant relativement bas, il est difficile, en se basant sur cette analyse, de conclure quant à une baisse éventuelle de l'apoptose dans les cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles.

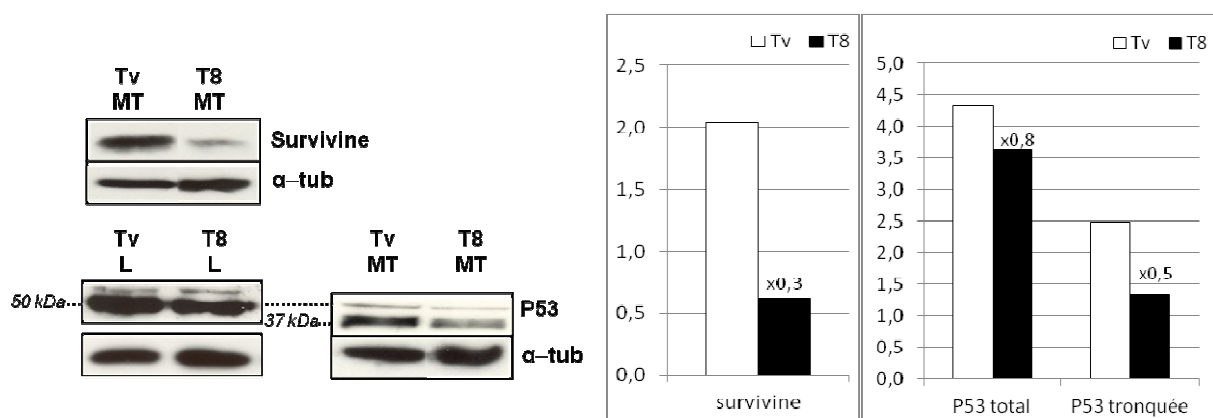


**Figure 42 : Quantification du pic sub-G1 du cycle cellulaire des cellules sensibles et résistantes**

Analyse du pic sub-G1 du cycle cellulaire par cytométrie en flux, par l'évaluation du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence (FL2-H), après perméabilisation et marquage à l'iodure de propidium des cellules Tv et T8, sur 10000 cellules comptées.

### III.2. Modification d'expression de protéines impliquées dans la signalisation de l'apoptose

Par ailleurs, une analyse par Western blot montre une diminution importante de l'accumulation sur les microtubules d'une protéine membre de la famille des inhibiteurs de l'apoptose, la survivine (Figure 43). De même, alors que l'expression globale de P53 dans des lysats cellulaires des cellules Tv et T8 ne semble pas être modifiée, nous observons une diminution de l'accumulation sur les microtubules d'une forme tronquée de cette protéine suppresseur de tumeur (Figure 43), dont certaines sont connues pour inhiber l'activité transcriptionnelle de la forme complète sauvage (Courtois *et al.* 2002).



**Figure 43 : Modification du recrutement de la survivine et de P53 sur les microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Analyse par Western blot de l'accumulation sur les microtubules de la survivine dans les fractions microtubulaires de cellules sensibles Tv et résistantes T8, et analyse de l'expression de P53 dans des lysats Tv et T8, ainsi que du recrutement d'une forme tronquée de P53 sur les microtubules Tv et T8. La quantification est présentée sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme marqueur de charge protéique.

### IV. DISCUSSION

Dans l'objectif d'étudier le ou les mécanismes cellulaires à l'origine d'une résistance chronique au Taxol, nous avons choisi d'établir une lignée MDA-MB 231 résistante à 25nM de Taxol (palier T8) par une méthode lente et progressive de franchissement de paliers. Nous avons ainsi créé la lignée T8, plus de 10 fois plus résistante au Taxol que la lignée sensible Tv.

Les mécanismes cellulaires mis en place par les cellules cancéreuses sont différents selon que les cellules sont soumises à une forte concentration en une seule fois (réaction ponctuelle) d'un anticancéreux ou à des expositions répétées à des concentrations bien plus faibles (résistance chronique).



De nombreuses études de la chimiorésistance au Taxol ont débuté par l'établissement d'une lignée résistante selon un protocole d'acquisition chronique similaire au nôtre (Giannakakou *et al.* 1997; Kavallaris *et al.* 1997; Banerjee 2002; Hari *et al.* 2006; Cicchillitti *et al.* 2009; Di Michele *et al.* 2009). Dans ces études, les expériences ont également été réalisées dans des conditions similaires aux nôtres, en cultivant en permanence les cellules résistantes en présence de Taxol. C'est le cas notamment des cellules MCF-7 provenant d'un adénocarcinome mammaire hormono-dépendant (ER positif) rendues résistantes à 30nM de Taxol par un protocole très similaire au nôtre (Banerjee 2002). Cependant, certaines études de chimiorésistance ont été menées sur des cellules traitées par une concentration élevée de Taxol (10 $\mu$ M) pendant une courte période (4h) précédant une expérience (Roberts *et al.* 1989), ou traitées par plusieurs expositions ponctuelles espacées dans le temps (10 expositions pulsées de 4h) (NicAmhlaibh *et al.* 1999). Ce type d'étude permet d'étudier les premières étapes de développement d'une chimiorésistance, qui mettent souvent en évidence une surexpression des pompes d'efflux (Davey and Davey 1998).

Il a été montré dans différentes lignées cellulaires que l'efficacité clinique maximale du Taxol pour la plupart des patients correspondrait à une exposition continue prolongée à une concentration plasmatique modérée ne dépassant pas 50nM (Liebmann *et al.* 1993). Notre choix du mode d'acquisition de la résistance par paliers progressifs ainsi que de la concentration de Taxol utilisée (palier T8 : 25nM) semble donc biologiquement pertinente puisque se situant dans l'index thérapeutique. En ce qui concerne la cytotoxicité du Taxol, de nombreuses lignées cellulaires sensibles à des agents pharmacologiques rapportent une IC<sub>50</sub> de Taxol située entre 2,5 et 7,5nM (Liebmann *et al.* 1993), alors qu'elle se situe entre 18nM (Kavallaris *et al.* 1997) et 71nM (Hari *et al.* 2006) dans diverses lignées cellulaires résistantes, soit respectivement 9 fois et 29 fois plus que les cellules sensibles correspondantes.

**Parmi les modifications d'expression protéique observées entre les cellules sensibles et résistantes, nous retrouvons une surexpression et une incorporation plus importante des isotypes  $\beta$ III et  $\beta$ IV de tubuline dans les microtubules des cellules résistantes T8.**

Une étude comparative des niveaux d'expression en ARNm des différents isotypes de  $\beta$ -tubuline dans différentes lignées cellulaires a mis en évidence que  $\beta$ I est l'isotype majoritaire constitutif des microtubules des cellules MDA-MB 231, comparativement aux isotypes  $\beta$ III,  $\beta$ IVb et  $\beta$ V qui sont bien plus faiblement représentés (Hiser *et al.* 2006). En revanche, les isotypes  $\beta$ II,  $\beta$ IVa et  $\beta$ VI ne sont pas présents dans cette lignée de cancer mammaire. Les isotypes III et IV de  $\beta$ -tubuline ayant une affinité réduite pour le Taxol (Panda *et al.* 1994), leur incorporation dans les microtubules des cellules résistantes MDA-MB 231 contribue certainement à limiter l'effet stabilisateur du Taxol. Ces isotypes ont en effet été reliés à la chimiorésistance au Taxol dans plusieurs études (Derry *et al.* 1997;

Kavallaris *et al.* 1997; Hari *et al.* 2003). D'autres isotypes de  $\beta$ -tubuline ont également été impliqués dans le phénomène de chimiorésistance. Ainsi, il a été montré que la surexpression de  $\beta$ V-tubuline dans des cellules CHO provoquait une désorganisation microtubulaire profonde et une dépendance au Taxol pour la croissance des cellules (Bhattacharya and Cabral 2004).

**L'étude de plusieurs paramètres liés à l'apoptose a révélé, non seulement de faibles pics sub-G1 au cours de l'analyse du cycle cellulaire chez les cellules MDA-MB 231 sensibles et résistantes, mais aussi une baisse du recrutement de la survivine et d'une forme tronquée de P53 sur les microtubules des cellules résistantes.**

La quantification du pic sub-G1 du cycle cellulaire chez les MDA-MB 231 suggère qu'il y a peu d'apoptose dans ces cellules, aussi bien chez les sensibles que chez les résistantes. L'effet inducteur d'apoptose du Taxol semble donc être contré dans les cellules résistantes T8. L'étude du niveau d'expression de la survivine a par ailleurs révélé une diminution de cette protéine de la famille des inhibiteurs de l'apoptose. Sachant que la déplétion par siRNA de la survivine augmente le nombre de microtubules nucléés ainsi que l'incidence de phénomènes de catastrophe (Rosa *et al.* 2006), le faible recrutement de cette protéine sur les microtubules des cellules résistantes T8 comparativement aux cellules sensibles Tv permettrait de contrecarrer l'effet du Taxol en contribuant à la récupération d'une certaine dynamique microtubulaire. D'autre part, bien que les cellules MDA-MB 231 synthétisent la forme mutée inactive de P53 (Bartek *et al.* 1990; Olivier *et al.* 2002), le recrutement accru d'une forme tronquée de P53 pourrait contribuer à l'inhibition de l'apoptose dans nos cellules résistantes. Comme P53 et la survivine, connues pour être localisées en partie au niveau des microtubules, de nombreuses autres protéines sont également associées au cytosquelette de microtubules et ces modifications d'expression ne sont certainement pas les seules responsables du phénotype chimiorésistant des cellules T8.

Ainsi, une étude comparative du protéome péri-microtubulaire des cellules Tv et T8 a été entreprise afin de mettre en évidence d'autres modulations d'expression qui pourraient être impliquées dans la résistance au Taxol.



## **PARTIE II : ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DES EXTRAITS MICROTUBULAIRES TOTAUX DES CELLULES Tv ET T8**

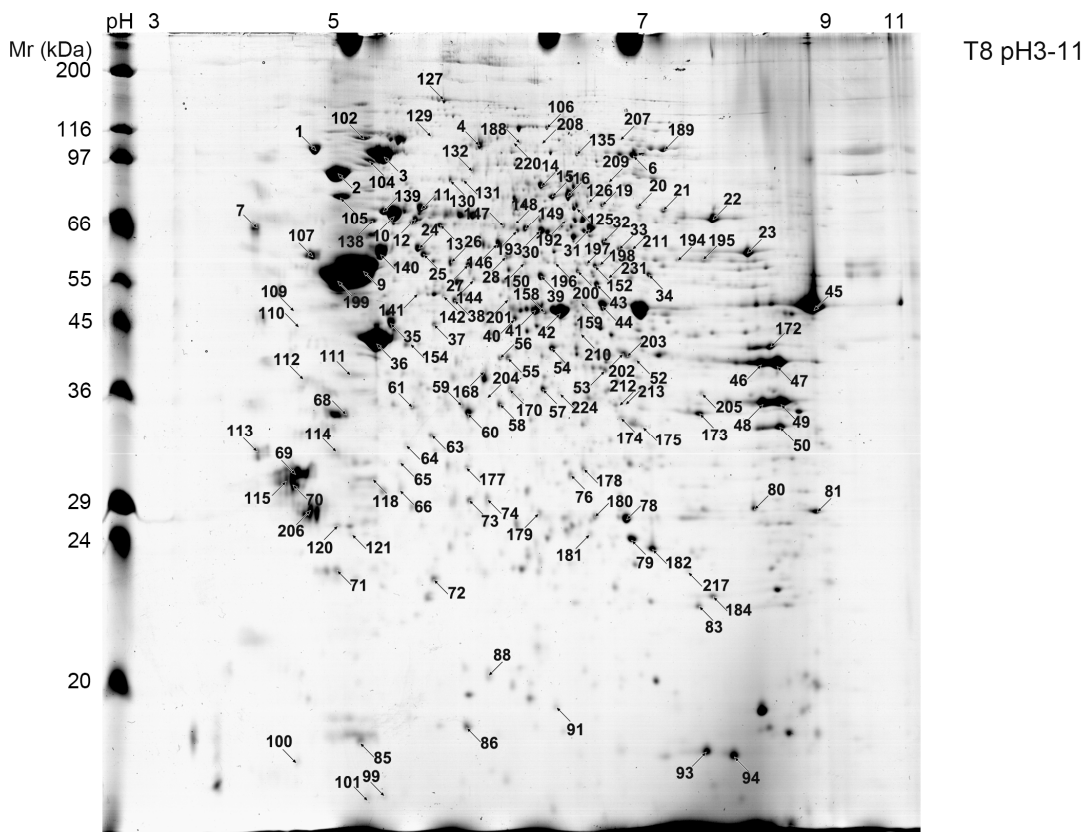
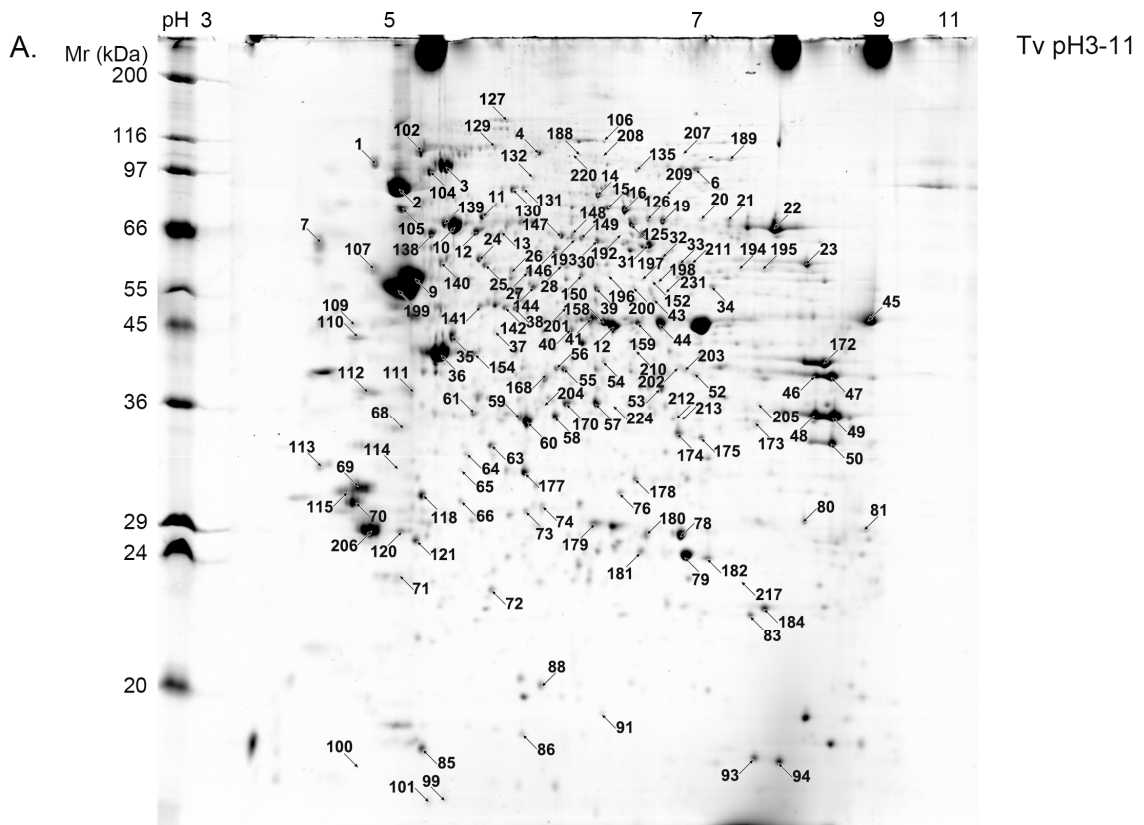
La résistance aux agents thérapeutiques anticancéreux est un phénomène complexe caractérisé par des altérations de l'expression ou de la fonction de nombreuses protéines. Afin d'identifier les protéines de l'environnement des microtubules impliquées dans le processus de chimiorésistance, nous avons entrepris une analyse comparative du protéome péri-microtubulaire, basée sur l'association de l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) et de la spectrométrie de masse (MS), à partir d'extraits microtubulaires de cellules MDA-MB 231 sensibles (Tv) et résistantes à 25nM de Taxol (T8).

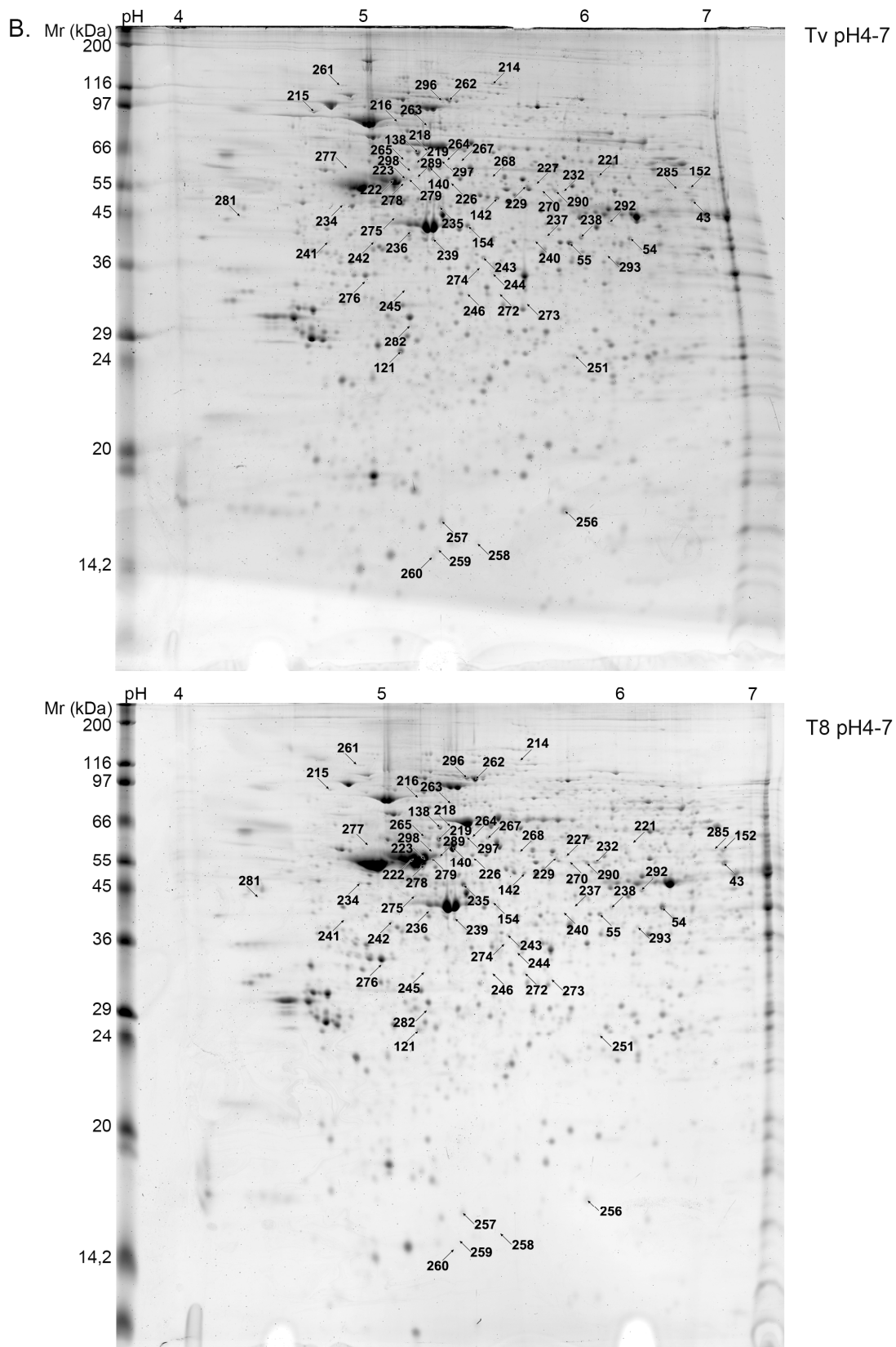
Cette partie de mon travail de thèse a récemment été publiée dans la revue *Proteomics* (Froidevaux-Klipfel *et al.* 2011) (Annexe 1).

### **I. CARTOGRAPHIE PROTEOMIQUE**

Dans un premier temps, nous avons réalisé une cartographie protéomique des extraits microtubulaires des cellules Tv et T8. Les isoélectrofocalisations ont d'abord été réalisées sur une gamme de pH large (pH3-11), puis sur une gamme de pH plus restreinte (pH4-7), étant donné que la plupart des protéines associées aux microtubules présentent des points isoélectriques (pI) situés dans cet intervalle de pH.

La Figure 44 montre quatre gels annotés d'extraits de microtubules totaux, les deux premiers (Figure 44 A) correspondant à l'emploi d'un gradient de pH3-11 en première dimension, et les deux suivants d'un gradient de pH4-7 (Figure 44 B). Tous les spots ayant une variation d'intensité détectable entre les gels Tv et T8 ont été excisés pour une identification par MS, de même que les spots d'intensité élevée. A partir de 298 spots excisés, 214 protéines ont été identifiées par MS, MALDI-TOF et/ou LC-MS/MS (Annexe 2). La LC-MS/MS a été entreprise lorsque les scores d'identification en MS par Peptide Mass Fingerprint (PMF) étaient trop bas ou lorsqu'aucun spectre n'avait pu être obtenu par l'analyse MALDI-TOF. Cependant, étant donné les faibles niveaux d'expression de certains polypeptides, toutes les protéines contenues dans les spots excisés n'ont pu être identifiées ni par MALDI-TOF ni par LC-MS/MS.





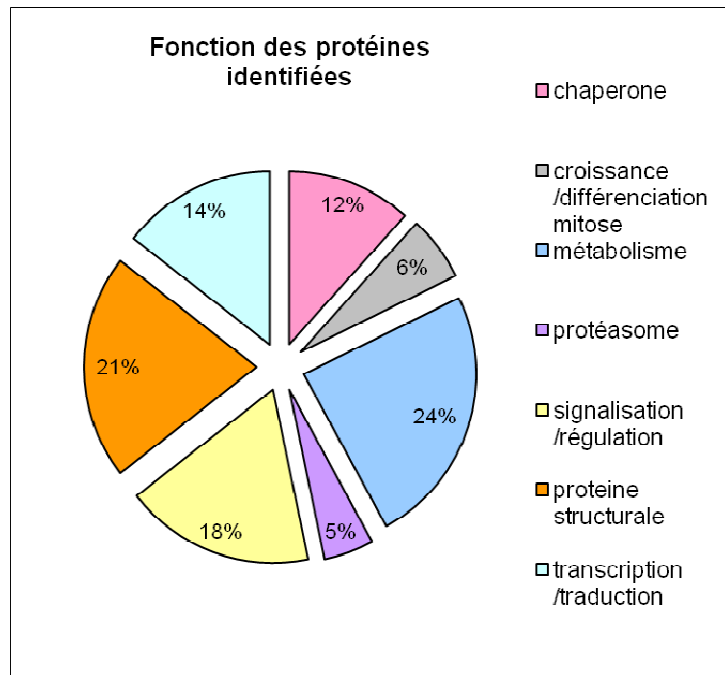
**Figure 44 : Cartographie protéomique comparative d'extraits microtubulaires de cellules Tv et T8**

**A :** gels à pH3-11, **B :** gels à pH4-7. Chaque gel est représentatif de trois extractions différentes de microtubules analysées en triplicats, soit 9 gels analysés par lignée.

Parmi les 214 protéines identifiées dans la cartographie protéomique d'extraits de microtubules totaux de cellules MDA-MB 231, 21% sont des protéines constitutives des microtubules, le reste étant des protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires comme la transcription/traduction, la signalisation ou encore la croissance/différenciation (Figure 45).

Les microtubules recrutent une grande variété de protéines du cytoplasme. Ils peuvent également interagir avec de nombreux organites et avec d'autres composants du cytosquelette. Ainsi, nous n'avons pas seulement mis en évidence des éléments structuraux des microtubules, tels que divers isotypes de tubuline et certaines sous-unités des moteurs moléculaires kinésine-1 et dynéine, mais aussi des éléments structuraux du cytosquelette d'actine, dont l'actine, l' $\alpha$ -actinine, la fascine, les filamines, la plastine, l'eitrine, la radixine et la moésine, la gelsoline et plusieurs isoformes de tropomyosines (Annexe 2).

Par ailleurs, des protéines régulatrices ont également été mises en évidence, comme la stathmine et plusieurs chaperonnes associées aux microtubules impliquées dans la signalisation cellulaire (telles que les isoformes d'HSP90, des FKBP, et des peptidyl-prolyl-isomérases). Des protéines régulatrices de l'organisation de l'actine comme la cofiline, CIP-4 (Cdc42-interacting protein-4), et Rho GDI (Rho GDP-dissociation inhibitor), ont également été retrouvées, de même que des septines, qui sont impliquées dans la cytokinèse et le contrôle du cycle cellulaire en relation avec le cytosquelette d'actine. De plus, nous avons mis en évidence de nombreuses protéines associées aux organites liés aux microtubules, tels que des éléments du réticulum endoplasmique (un précurseur de la calréticuline, des disulfures-isomérases), du noyau (comme les importines), ou qui sont associées au trafic membranaire (Arf-1, l'inhibiteur de dissociation Rab-GDI, et la clathrine). Les autres protéines sont principalement des éléments de la machinerie du protéasome, des enzymes du métabolisme, ainsi que des composants de la machinerie de la traduction (Annexe 2 et Figure 45).



**Figure 45 : Représentation graphique à secteurs des fonctions des protéines péri-microtubulaires identifiées**

## II. ETUDE COMPARATIVE DU PROTEOME PERI-MICROTUBULAIRE DES CELLULES SENSIBLES ET RESISTANTES AU TAXOL

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les intensités des spots des gels de cette cartographie (pH3-11 et pH4-7), afin d'étudier les différences de recrutement sur les microtubules des protéines péri-microtubulaires entre cellules sensibles et cellules résistantes au Taxol.

Parmi les 214 protéines identifiées lors de la cartographie, 112 sont différentiellement enrichies dans les fractions microtubulaires des cellules T8 par comparaison aux cellules Tv. Parmi celles-ci, on retrouve respectivement une augmentation et une diminution du recrutement de 73 et 39 protéines sur les microtubules de la lignée T8.

La plupart de ces modifications concernent des protéines structurales et des chaperonnes, ainsi que des enzymes métaboliques, des protéines impliquées dans la traduction protéique, la mitose, la croissance et la différenciation cellulaire, ou encore la signalisation (Tableau XXX). Alors qu'aucun lien évident n'a pu être établi entre la résistance au Taxol et les protéines du métabolisme que nous avons retrouvées dans notre différentiel (catalase, spermidine synthase, fructose-*bis*-phosphate aldolase...) ou avec l'augmentation de protéines impliquées dans le trafic membranaire (sorting nexin-4, syntaxin-binding protein 2...), certaines protéines différentiellement recrutées sur les microtubules pourraient être ou ont déjà été mises en évidence comme étant impliquées dans la régulation de la dynamique microtubulaire ou les phénomènes de chimiorésistance.



**Tableau XXX : Protéines différentiellement exprimées et enrichies dans la fraction microtubulaire des cellules sensibles et résistantes au Taxol**

Spot number <sup>(a)</sup>	Protein name	Biological process	Accession number in UniProtKB/Swiss-Prot	Gel identification	Median Ratio <sup>(b)</sup>	Regulation in T8 vs Tv	Kolmogorov score <sup>(c)</sup>	Link with cytoskeleton
206	14-3-3 protein zeta/delta	signaling	Q6P3U9	pH 3-11	2.24	down	0.714286	J Neurochem, 2009; 108(1): 33-43
258	14 kDa phosphohistidine phosphatase	signaling	Q9NRX4	pH 4-7	2.11	down	0.888889	Lung Cancer, 2010; 67(1): 48-56
140	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	chaperone	P10809	pH 4-7	2.89	up	0.666667	J Biol Chem, 2008; 283(8): 5188-94
236	Actin, aortic smooth muscle	structural protein	P62736	pH 4-7	2.58	down	0.652778	
224	AH receptor-interacting protein	signaling	O00170	pH 3-11	2.97	up	0.571429	J Biol Chem, 2006; 281(34): 24721-7
290	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	metabolism	P05091	pH 4-7	2.32	up	0.763889	Semin Oncol, 1997; 24(5): 580-91
205	Aldo-keto reductase family 1 member C3	metabolism	Q9UKL9	pH 3-11	3.75	up	0.714286	
204	Annexin A1	signaling	P04083	pH 3-11	3.00	down	0.714286	
173, 213	Annexin A2	signaling	P07355	pH 3-11	3.20	up	0.714286	
272	Annexin A3	signaling	P12429	pH 4-7	2.87	up	0.666667	
273	Annexin A4	signaling	P09525	pH 4-7	4.17	up	0.777778	
192	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transcription/translation	P54136	pH 3-11	2.53	up	0.714286	
200	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	metabolism	P14868	pH 3-11	2.08	up	0.714286	
261	Bifunctional protein NCOAT	transcription/translation	O60502	pH 4-7	2.30	down	0.652778	
189	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	metabolism	P11586	pH 3-11	2.11	up	0.714286	
211	Catalase	metabolism	P04040	pH 3-11	2.34	down	0.714286	Autophagy, 2008; 4(8): 1009-19
281	Calumenin	signaling	O43852	pH 4-7	4.58	down	0.763889	
220	Catenin alpha-1	structural protein	P35221	pH 3-11	3.32	up	0.571429	Cell Cycle, 2008; 7(15): 2377-83
263	Cdc42-interacting protein 4	signaling	Q96RJ1	pH 4-7	3.39	up	0.666667	J Exp Med, 2007; 204(10): 2305-20
246	Chloride intracellular channel protein 4	signaling	Q9Y696	pH 4-7	2.79	down	0.750000	Cell Motil Cytoskeleton, 2003; 56(3): 159-72
257	Coactosin-like protein	structural protein	Q14019	pH 4-7	2.10	down	0.777778	
154	Creatine kinase B-type	signaling	P12277	both	3.06	down	1.00000	Embo J, 2010; 29(4): 843-54
210	Cystathionine gamma-lyase	metabolism	P32929	pH 3-11	2.16	down	0.714286	
221	<b>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1</b>	structural protein	Q9Y6G9	pH 4-7	3.98	down	0.652778	J Cell Biol, 1993 Nov; 123(4):849-58
197, 285	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	metabolism	O43175	both	3.17	up	0.571429	Biochim Biophys Acta, 1989; 999(1): 64-70
268	Dihydropyrimidinase-related protein 2	growth/differentiation/	Q16555	pH 4-7	2.37	up	0.888889	Nat Cell Biol, 2002; 4(8): 583-91

		mitosis						
196	DnaJ homolog subfamily C member 3	chaperone	Q13217	pH 3-11	2.41	up	0.714286	
276	Elongation factor 1-delta	transcription/ translation	P29692	pH 4-7	2.55	up	0.875000	J Biol Chem, 2003; 278(34): 32115-23
43	Elongation factor 1-gamma	transcription/ translation	P26641	both	4.34	up	0.714286	
207	Elongation factor 2	transcription/ translation	P13639	pH 3-11	2.97	up	0.714286	
268	Eukaryotic translation initiation factor 5	transcription/ translation	P55010	pH 4-7	2.37	up	0.888889	
209	Far upstream element-binding protein 2	transcription/ translation	Q92945	pH 3-11	2.33	up	0.714286	Hepatology, 2009; 50(4): 1130-9
231	Fascin	structural protein	Q16658	pH 3-11	3.46	up	0.714286	
188	Filamin-A	structural protein	P21333	pH 3-11	2.98	up	0.714286	
188	Filamin-B	structural protein	Q9NRB5	pH 3-11	2.98	up	0.714286	
268	FK506-binding protein 4	growth/ differentiation/ mitosis	Q02790	pH 4-7	2.37	up	0.888889	Faseb J, 2007; 21(11): 2787-97
217	Flavin reductase	metabolism	P30043	pH 3-11	2.09	up	0.857143	
202	Fructose-bisphosphate aldolase	metabolism	P09972	pH 3-11	3.02	up	0.714286	Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995; 112(3): 503-14
152, 197, 198, 285	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	metabolism	P11413	both	2.01	up	0.857143	
142	Glutathione synthetase	metabolism	P48637	pH 4-7	2.17	down	0.888889	
246	Glyoxalase domain-containing protein 4	metabolism	Q9HC38	pH 4-7	2.79	down	0.750000	
215, 216	Heat shock protein HSP 90-alpha	chaperone	P07900	pH 4-7	2.32	down	0.666667	Cell Signal, 2009; 21(4): 529-39
216	Heat shock protein HSP 90-beta	chaperone	P08238	pH 4-7	2.33	down	0.666667	Cell Signal, 2009; 21(4): 529-39
205	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	transcription/ translation	Q99729	pH 3-11	3.75	up	0.714286	
201, 232, 270	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	transcription/ translation	P31943	both	2.94	up	0.714286	
232	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	transcription/ translation	P55795	pH 4-7	6.97	up	0.777778	
235	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	transcription/ translation	P52597	pH 4-7	2.67	up	1.00000	
219, 264, 265, 267, 297	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	transcription/ translation	P61978	pH 4-7	7.14	up	1.00000	
207	Hexokinase-1	metabolism	P19367	pH 3-11	2.97	up	0.714286	
236	Hsp70-binding protein 1	chaperone	Q9NZL4	pH 4-7	2.58	down	0.652778	

289	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	metabolism	Q01581	pH 4-7	2.19	up	0.763889	
277	Importin subunit alpha-7	signaling	O60684	pH 4-7	6.28	up	0.777778	
215	Importin subunit beta-1	signaling	Q14974	pH 4-7	2.25	down	0.777778	Science, 2001; 291(5504): 653-6
198	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	metabolism	P12268	pH 3-11	2.01	up	0.857143	
220	Insulin-degrading enzyme	signaling	P14735	pH 3-11	3.32	up	0.571429	
106	<b>Kinesin-1 heavy chain</b>	signaling	P33176	pH 3-11	2.76	up	0.857143	Cell, 1985 August; 42(1): 39-50
60, 244	L-lactate dehydrogenase B chain	metabolism	P07195	both	3.34	down	1.00000	
147	Leukotriene A-4 hydrolase	metabolism	P09960	pH 3-11	2.27	down	1.00000	
55, 240	Macrophage-capping protein	structural protein	P40121	both	2.14	down	0.875000	Biochem Biophys Res Commun, 2009; 380(1): 166-70
262, 296	Major vault protein	signaling	Q14764	pH 4-7	2.51	up	0.638889	J Biol Chem, 1998; 273(15): 8971-4
174, 212, 213	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	metabolism	P40925	pH 3-11	2.67	down	1.00000	
275	NSFL1 cofactor p47	signaling	Q9UNZ2	pH 4-7	2.29	up	1.00000	
292	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	metabolism	P04181	pH 4-7	2.19	up	0.666667	
293	PDZ domain-containing protein GIPC1	signaling	O14908	pH 4-7	4.28	up	0.875000	Mol Biol Cell, 2005; 16(9): 4183-201
246	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	transcription/ translation	Q9UNP9	pH 4-7	2.79	down	0.750000	
194	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	metabolism	Q9Y285	pH 3-11	2.19	up	0.714286	
214	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	metabolism	O15067	pH 4-7	2.05	down	0.888889	
218	Plastin-1	structural protein	Q14651	pH 4-7	2.46	down	0.888889	
138, 218	Plastin-2	structural protein	P13796	pH 4-7	2.46	down	0.888889	
218	Plastin-3	structural protein	P13797	pH 4-7	2.46	down	0.888889	
203	Poly(rC)-binding protein 1	transcription/ translation	Q15365	pH 3-11	4.87	up	0.714286	
196	Pre-mRNA-processing factor 19	transcription/ translation	Q9UMS4	pH 3-11	2.41	up	0.714286	
236	Protein arginine N-methyltransferase 1	transcription/ translation	Q9NZ06	pH 4-7	2.58	down	0.652778	
268	Protein disulfide-isomerase A3	chaperone	P30101	pH 4-7	2.37	up	0.888889	J Proteome Res, 2009; 8(4): 1902-12
209	Protein transport protein Sec23A	structural protein	Q15436	pH 3-11	2.33	up	0.714286	
213	Putative quinone oxidoreductase	metabolism	Q53FA7	pH 3-11	3.20	up	0.714286	
211	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	metabolism	Q9BWB5	pH 3-11	2.34	down	0.714286	
298	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	signaling	P52306	pH 4-7	2.59	up	0.666667	
121	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	signaling	P52566	pH 4-7	3.30	down	1.00000	
54	<b>Septin-2</b>	growth/ differentiation/ mitosis	Q15019	both	3.21	up	1.00000	Genes Dev, 1997; 11(12): 1535-47.

290	<b>Septin-8</b>	growth/ differentiation/ mitosis	Q92599	pH 4-7	2.32	up	0.763889	J Neurochem. 2009; 108(4): 867-80
43	<b>Septin-11</b>	growth/ differentiation/ mitosis	Q9NVA2	both	4.34	up	0.714286	FEBS Lett. 2004; 568(1-3): 83-8
274	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	metabolism	P62140	pH 4-7	4.37	up	1.00000	
239	Serpin B6	signaling	P35237	pH 4-7	2.20	down	0.888889	
259, 260	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	signaling	O75368	pH 4-7	3.03	down	0.666667	
227	Sorting nexin-4	signaling	O95219	pH4 -7	2.62	up	0.666667	Nat Cell Biol, 2007; 9(12): 1370-80
245	Spermidine synthase	metabolism	P19623	pH 4-7	2.59	up	0.541667	Eur J Histochem, 1994; 38(3): 245-52
268	Spliceosome RNA helicase BAT1	transcription/ translation	Q13838	pH 4-7	2.37	up	0.888889	
207	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	transcription/ translation	Q7KZF4	pH 3-11	2.97	up	0.714286	
242	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	proteasome	Q9Y2Z0	pH 4-7	2.26	up	0.763889	
192	Syntaxin-binding protein 2	signaling	Q15833	pH 3-11	2.53	up	0.714286	J Cell Sci, 2003; 116(Pt 2): 325-34
195	T-complex protein 1 subunit eta	chaperone	Q99832	pH 3-11	2.34	down	0.714286	Biochim Biophys Acta, 2001; 1522(1): 9-21
260	Thioredoxin domain-containing protein 17	signaling	Q9BRA2	pH 4-7	3.03	down	0.666667	Proc Natl Acad Sci U S A, 2007; 104(9): 3336-41
204	Transaldolase	metabolism	P37837	pH 3-11	3.00	down	0.714286	Metabolism, 2005; 54(8): 1027-33
79, 181	Triosephosphate isomerase	metabolism	P60174	pH 3-11	2.63	down	0.714286	Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995; 112(3): 503-14
279, 289, 298	<b>Tubulin alpha-1A chain</b>	structural protein	Q71U36	pH 4-7	2.19	up	0.763889	
222, 223, 278, 279	<b>Tubulin alpha-1B chain</b>	structural protein	P68363	pH 4-7	10.18	up	0.763889	
222, 278, 279	<b>Tubulin alpha-1C chain</b>	structural protein	Q9BQE3	pH 4-7	2.25	up	0.763889	
222, 223	<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	structural protein	P68366	pH 4-7	10.18	up	0.763889	
279	<b>Tubulin alpha-3C/D chain</b>	structural protein	Q13748	pH 4-7	3.39	up	0.541667	
223	<b>Tubulin alpha-8 chain</b>	structural protein	Q9NY65	pH 4-7	10.18	up	1.00000	
199, 277	<b>Tubulin beta chain</b>	structural protein	P07437	pH 3-11	6.28	up	0.777778	
199, 277	<b>Tubulin beta-2A chain</b>	structural protein	Q13885	pH 3-11	6.28	up	0.777778	
199	<b>Tubulin beta-2B chain</b>	structural protein	Q9BVA1	pH 3-11	4.07	up	0.571429	
199, 277	<b>Tubulin beta-2C chain</b>	structural protein	P68371	pH 3-11	6.28	up	0.777778	
199	<b>Tubulin beta-3 chain</b>	structural protein	Q13509	pH 3-11	4.07	up	0.571429	
199	<b>Tubulin beta-4 chain</b>	structural protein	P04350	pH 3-11	4.07	up	0.571429	

199, 277	<b>Tubulin beta-6 chain</b>	structural protein	Q9BUF5	pH 3-11	6.28	up	0.777778	
211	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transcription/ translation	P54577	pH 3-11	2.34	down	0.714286	
256	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	growth/ differentiation/ mitosis	P61088	pH 4-7	2.16	down	0.888889	
211	UDP-glucose 6-dehydrogenase	metabolism	O60701	pH 3-11	2.34	down	0.714286	
268	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	metabolism	P21281	pH 4-7	2.37	up	0.888889	

proteins identified in *Xenopus* Meiotic Microtubule-Associated proteome - Gache V, 2010

proteins identified in Microtubule-associated Proteins during Macrophage Activation - Patel PC, 2009

proteins identified in Proteomic profiling of Taxol-resistant MCF-7 breast cancer cells – Chuthapisith S, 2007

proteins frequently identified in proteomics - Petrak J, 2008

Microtubule-Associated proteins of interest in our study

(a) The spots numbering corresponds to the 2-DE gels in Fig. 2A and 2B.

(b) Median ratio: ratio between the median values of both classes Tv and T8. Median ratio >2 was considered significant

(c) Kolmogorov-Smirnov test: this test tries to determine if two data sets differ significantly, with continuous probability distributions and mutually independent two samples. For pH3-11 gels, n=14 gels, p=0.01, Kolmogorov values >0.418 were considered significant. For pH4-7 gels, n=17 gels, p=0.01, Kolmogorov values >0.381 were considered significant.

Des protéines, dont l'expression est augmentée dans les cellules résistantes, sont connues pour être impliquées dans la croissance cellulaire et la différenciation. En se liant directement à la survivine, la protéine d'interaction au récepteur AH (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein) pourrait stabiliser cet inhibiteur d'apoptose (Kang and Altieri 2006). Aussi, la protéine GIPC1, contenant un domaine PDZ, est connue pour interagir avec le facteur d'échange nucléotidique MyoGEF promouvant ainsi la polarisation cellulaire et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231 (Wu *et al.* 2010). A l'inverse, la protéine MVP (major vault protein), que nous avons retrouvé augmentée dans les cellules résistantes, et qui est habituellement surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires multi-résistantes, n'est pas censée participer à la chimiorésistance, puisque son inhibition ne restaure pas la sensibilité à l'agent pharmacologique (Huffman and Corey 2005).

Plusieurs modifications de recrutement de protéines sur les microtubules entre les cellules Tv et T8 pourraient avoir un lien avec la polymérisation des microtubules. C'est le cas de la protéine CRMP2 (Tableau XXX), qui augmente dans les cellules résistantes, et dont la capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules a été mise en évidence dans des axones en croissance (Fukata *et al.* 2002). De même, l'augmentation de la caténine- $\alpha 1$  que nous observons dans les cellules T8 pourrait accroître la longueur et la densité des microtubules (Shtutman *et al.* 2008). En ce qui concerne les protéines de la machinerie de transcription/traduction, la protéine FBP2, membre de la famille des FBP (far-upstream element binding protein), qui a été décrite comme promotrice de la croissance tumorale dans diverses lignées cellulaires d'hépatocarcinomes, en contrôlant l'expression de la stathmine, un facteur déstabilisateur de microtubules (Malz *et al.* 2009), se retrouve également recrutée de façon plus importante sur les microtubules de la lignée résistante T8.

De façon intéressante, certaines modifications de recrutement pourraient potentiellement être liées à une modulation de la dynamique microtubulaire. C'est le cas de certains isotypes de tubuline, des moteurs moléculaires kinésine et dynéine et des septines, auxquels nous nous sommes davantage intéressés par la suite, et qui ont été confirmées par Western blot (Figure 46). L'analyse des lysats cellulaires nous renseigne sur un changement éventuel d'expression de la protéine d'intérêt alors que la comparaison des fractions cytosoliques et microtubulaires entre les cellules Tv et T8 permet de révéler une modification du recrutement sur les microtubules.

La faible augmentation des isoformes de tubuline que nous observons dans les lysats des cellules T8 a probablement pour origine un assemblage plus important de tubuline en présence de Taxol, comme le suggèrent l'augmentation de la masse du polymère et la diminution de la tubuline soluble (Figure 46 A). Plus précisément, une augmentation de l'expression des isotypes  $\beta III$  et  $\beta IV$  de tubuline (Figure 41 et Figure 46) et de l'assemblage en microtubules (Figure 46) a également été détectée.

Outre les modifications des niveaux de tubulines, nous avons également remarqué une légère augmentation du niveau d'expression de la chaîne lourde de la kinésine-1 (Kinesin-1 Heavy Chain,

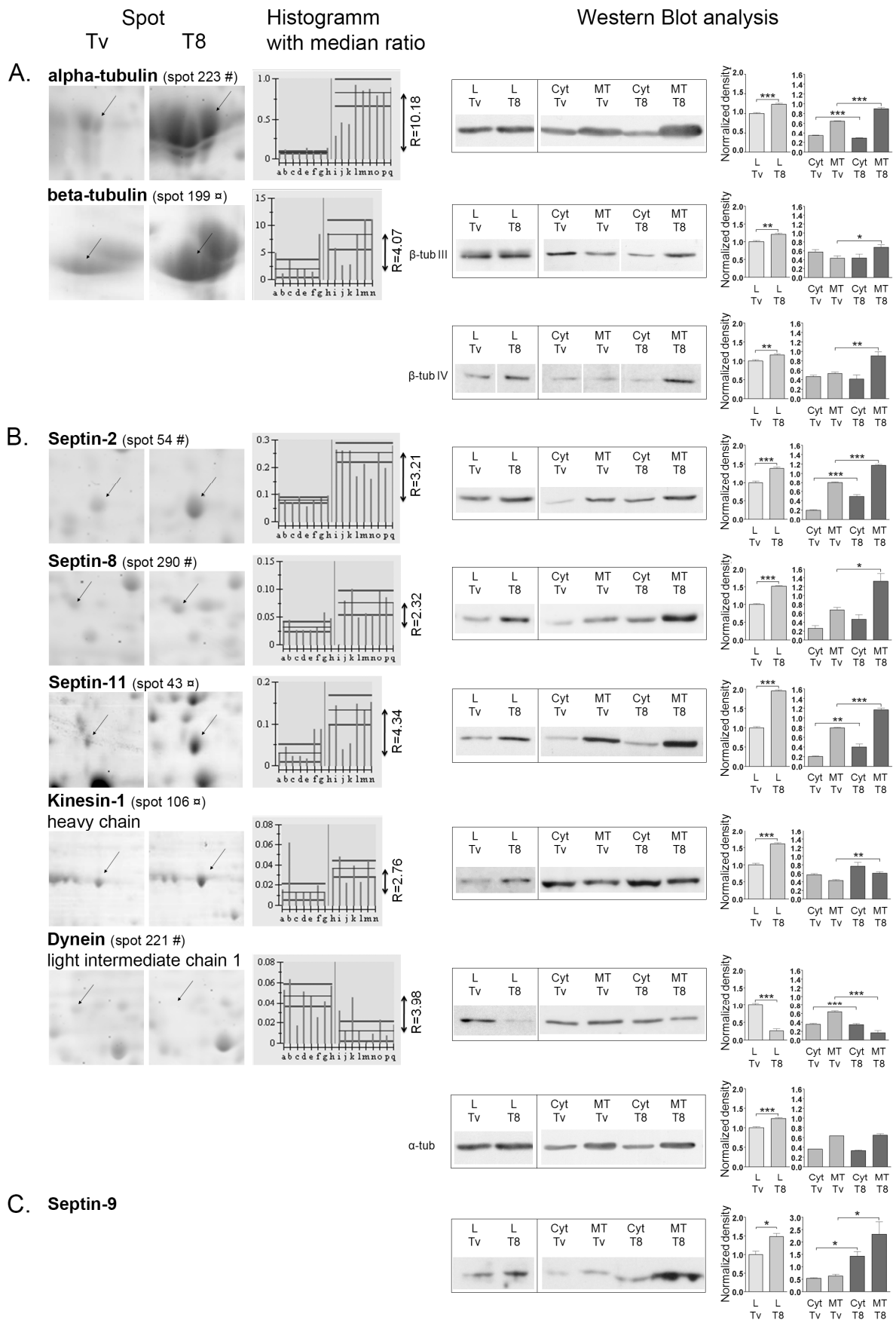
KHC), alors que celui de la chaîne légère intermédiaire-1 de la dynéine diminue considérablement (Figure 46 B).

De façon intéressante, l'expression de trois septines (SEPT2, SEPT8 et SEPT11) est globalement augmentée de deux à plus de quatre fois dans la lignée résistante, allant de paire avec un recrutement accru sur les microtubules des cellules T8 par comparaison aux Tv (Figure 46 B). Cependant, d'autres septines que nous n'avons pas détectées par l'approche protéomique augmentent également dans les cellules résistantes. C'est le cas de SEPT9, connue pour être impliquée dans certains cancers ; comme son pI est de 9,3 (Kinoshita 2003b), elle n'a donc pas pu être détectée sur les gels 2D à cause de sa migration dans une zone de pH mal focalisée dans les gradients choisis. Néanmoins, l'analyse par Western blot de SEPT9 révèle à la fois sa surexpression et son recrutement sur les microtubules des cellules T8 (Figure 46 C).

---

**Figure 46 : Analyse comparative par Western blot de lysats et d'extraits subcellulaires de cellules sensibles Tv et résistantes T8 au Taxol**

**A et B :** Les spots 2-DE issus des gels Tv et T8 (avec le numéro de spot correspondant et l'annotation  $\boxtimes$  pour les gels à pH3-11 colorés au Bleu de Coomassie, ou # pour les gels à pH4-7 colorés au SYPRO Ruby), correspondant aux protéines d'intérêt (flèches), sont reportés à côté d'histogrammes représentant les intensités intégrées de ces spots dans chaque gel (n=7 à 9 gels par classe Tv ou T8). Les lignes horizontales représentent la médiane  $\pm$  s.e.m. des valeurs. *R* est le ratio des médianes entre les extraits microtubulaires Tv et T8 (l'expression différentielle est considérée comme significative pour les protéines ayant un *R*>2 et un test de Kolmogorov-Smirnov positif). La modulation de l'expression protéique (lysats totaux ; L) et du recrutement sur les microtubules (cytosol et fractions microtubulaires ; Cyt et MT) des tubulines (**A**) et des protéines d'intérêt différemment exprimées (**B**) ont été vérifiées par Western blot. Pour (**A**), tous les échantillons ont été déposés à quantités de protéines égales (20 $\mu$ g). Pour (**B**), les lysats ont été déposés à quantités de protéines égales (20 $\mu$ g), alors que les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités d' $\alpha$ -tubuline égales. Les fractions Cyt et MT ont été déposées sur la base d'un volume équivalent pour chaque lignée. Le panneau  $\alpha$ -tubuline du bas est le contrôle de charge protéique. **C :** L'expression de SEPT9 (lysats totaux) et son recrutement sur les microtubules (fractions Cyt et MT) des cellules Tv et T8 ont été analysés par Western Blot. Le dépôt des échantillons a été réalisé dans les mêmes conditions que (**B**). Les histogrammes représentés à droite des Western blots (**A-C**) représentent les variations des bandes entre quatre expériences indépendantes au minimum. Les barres d'erreurs correspondent à la moyenne  $\pm$  s.e.m. des densités intégrées des bandes. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .





### III. ANALYSE DU NIVEAU D'EXPRESSION GENIQUE DES SEPTINES

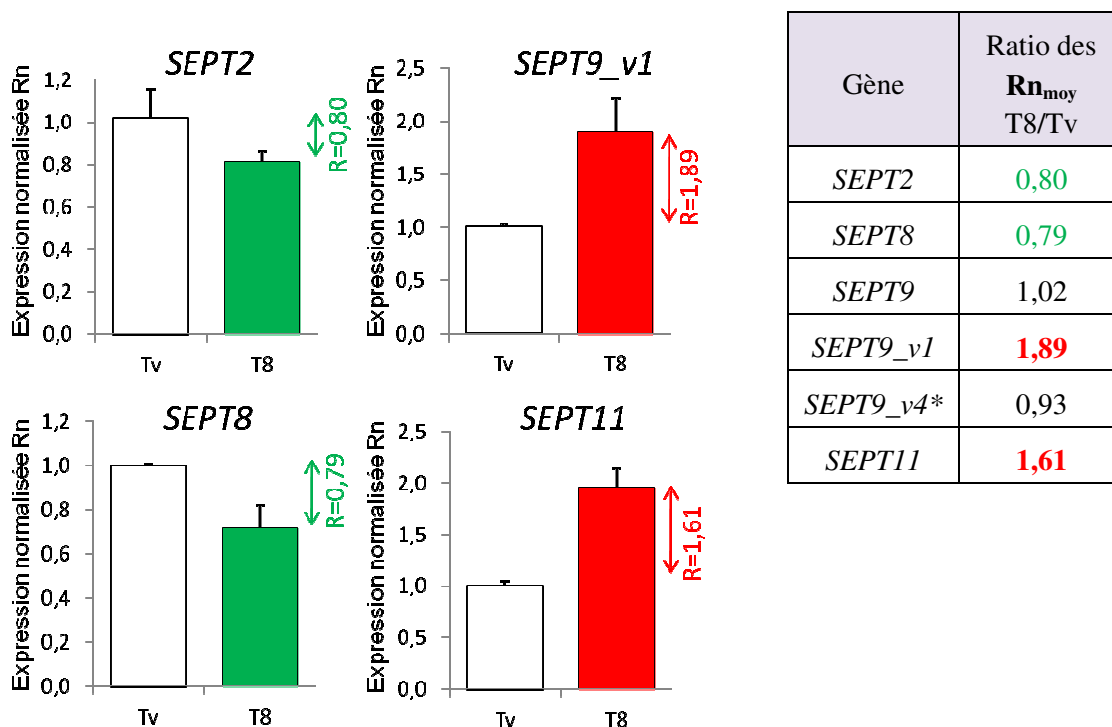
Afin de comparer l'expression relative des gènes codant les septines variant entre les cellules sensibles et résistantes, les teneurs en ARNm ont été analysées par PCR quantitative en temps réel, après extraction et transcription inverse des ARNs des cellules sensibles et des cellules résistantes.

Trois extractions indépendantes d'ARN totaux ont été réalisées, et chaque couple d'amorces a été volontairement désigné de façon à amplifier spécifiquement chaque gène cible, mais aussi tous les variants connus d'une même protéine. Par exemple, les amorces pour *SEPT9* sont susceptibles de quantifier les 11 transcrits connus (Russell and Hall 2011) de cette septine. Pour cela, des amorces spécifiques de deux de ses variants, *SEPT9\_v1* et *SEPT9\_v4\**, dont les isoformes sont connues pour être impliquées dans la résistance au Taxol de certains cancers du sein et de l'ovaire (Scott *et al.* 2005), ont également été intégrées à cette étude. Après normalisation par rapport à la quantité d'ARNm de trois gènes de référence, *GAPDH* (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), *18S* (ARN ribosomique 18S) et *TBP-H2* (TATA box binding protein), qui sont des gènes ubiquitaires dont l'expression s'est révélée constante dans notre modèle biologique, les résultats sont exprimés sous forme relative, T8 versus Tv (Figure 47).

Cette étude a mis en évidence, non seulement le niveau d'expression génique de ces septines par leur Ct moyens (Tableau XXXI), mais aussi une augmentation significative de l'expression relative (Rn) des gènes codant *SEPT9\_v1* et *SEPT11*, respectivement de 89 et 61% chez les cellules résistantes T8 par rapport aux cellules sensibles Tv (Figure 47). Les Ct obtenus pour le gène *SEPT8* (environ 33) (Tableau XXXI), indiquent que cette dernière est moins exprimée dans nos cellules que les autres septines. Par ailleurs, une diminution significative de l'expression des gènes codant *SEPT2* et *SEPT8* est observée chez les T8 (Figure 47). Enfin, l'expression des gènes *SEPT9* et *SEPT9\_v4\** est restée stable au cours de l'acquisition de la résistance au Taxol des cellules MDA-MB 231 (Figure 47).

**Tableau XXXI : Variation des Ct moyens des gènes de septines chez les cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Gène	Ct <sub>moy</sub> chez les Tv	Ct <sub>moy</sub> chez les T8
<i>SEPT2</i>	31,58 ±1,03	32,15 ±1,77
<i>SEPT8</i>	33,72 ±0,90	33,65 ±1,51
<i>SEPT9</i>	24,76 ±0,73	25,02 ±0,62
<i>SEPT9_v1</i>	27,28 ±0,72	28,08 ±0,64
<i>SEPT9_v4*</i>	29,07 ±0,85	29,56 ±0,97
<i>SEPT11</i>	27,05 ±0,98	26,54 ±0,48



**Figure 47 : Variation de la quantité des transcrits de septines dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Analyse par qRT-PCR du niveau d'ARNm des septines *SEPT2/8/9/9\_v1-3/9\_v4*, avec représentation sous forme d'histogrammes des moyennes ±écart-type des expressions relatives des transcrits présentant des variations significatives. Le tableau récapitule le ratio des expressions normalisées moyennes (Rn<sub>moy</sub>) des gènes entre les cellules Tv et T8

## IV. DISCUSSION

**Une cartographie protéomique d'extraits de microtubules totaux de cellules MDA-MB 231 a permis d'identifier 214 protéines, parmi lesquelles on retrouve des protéines constitutives des microtubules, mais aussi des protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires comme la transcription/traduction, la signalisation ou encore la croissance/différenciation.**

La majorité des protéines identifiées dans notre étude ont déjà été retrouvées dans l'environnement des microtubules au cours d'études protéomiques précédentes, par exemple sur des microtubules méiotiques d'oocytes de Xénope (Gache *et al.* 2010) ou dans des macrophages activés ou au repos (Patel *et al.* 2009). Cependant, parmi les protéines identifiées figurent également des protéines ayant été décrites comme non spécifiquement détectées dans une méta-analyse protéomique (Pettrak *et al.* 2008), et notamment certaines annexines, les protéines disulfure-isoméras, les émolases et certaines chaperonnes telles que le précurseur mitochondrial d'HSP60. Toutes les chaperonnes ne sont toutefois pas suspectes. La présence d'HSP90 (à la fois ses formes constitutive et induite) dans l'environnement microtubulaire a été documentée depuis longtemps (Redmond *et al.* 1989; Garnier *et al.* 1998). Au cours de ses travaux de thèse au laboratoire, J. Giustiniani a démontré que le recrutement d'HSP90 au niveau des microtubules était stimulée lorsque la tubuline était acétylée, et favorisait le recrutement de facteurs de signalisation (Giustiniani *et al.* 2009a; Giustiniani *et al.* 2009b). De même, l'annexine A2, une protéine de liaison calcium-dépendante aux phospholipides, qui est fréquemment retrouvée dans les analyses protéomiques comparatives (Chuthapisith *et al.* 2007; Gache *et al.* 2010), et qui augmente également dans notre étude, semble jouer un rôle dans l'efflux d'agents pharmacologiques par exocytose vésiculaire (Wang *et al.* 2004).

Bien que les mécanismes de chimiorésistance ne soient pas encore bien connus, seules quelques études protéomiques visant à identifier des biomarqueurs de résistance des cancers du sein ont été reportées à ce jour (Brown and Fenselau 2004; Gehrmann *et al.* 2004; Chuthapisith *et al.* 2007). La comparaison des profils d'expression de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine et au paclitaxel (Gehrmann *et al.* 2004; Chuthapisith *et al.* 2007) ont montré que les protéines différenciellement exprimées impliquaient seulement des protéines du métabolisme du glucose ou des protéines liées au cycle cellulaire et à l'apoptose, mais aussi des protéines de choc thermique, des enzymes de détoxification ou encore des protéines de liaison au calcium. Les protéines qui varient à la fois dans les cellules résistantes au paclitaxel MCF-7 et MDA-MB 231 (dans notre étude) appartiennent à un groupe de protéines fréquemment retrouvées dans les études protéomiques, donc probablement non spécifiques, soulignant l'intérêt de travailler sur des fractions subcellulaires plus restreintes telles que les microtubules.

**L'analyse protéomique comparative d'extraits microtubulaires de cellules sensibles Tv et résistantes T8 a mis en évidence des modifications de l'expression et du recrutement de septines et de moteurs moléculaires sur les microtubules, suggérant que ces protéines ne sont pas seulement modulées dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules saines, mais pourraient également refléter des mécanismes d'adaptation ciblant la dynamique microtubulaire pour conférer une résistance au Taxol.**

Comme nous l'avons déjà décrit lors de l'établissement de la lignée résistante MDA-MB T8, de nombreux auteurs ont démontré que les isotypes III, IV (que nous retrouvons davantage incorporés dans les microtubules des cellules résistantes) et l'isotype V de  $\beta$ -tubuline participent à l'acquisition de la résistance au Taxol en modulant l'instabilité dynamique des microtubules (Derry *et al.* 1997; Kavallaris *et al.* 1997; Goncalves *et al.* 2001; Hari *et al.* 2003; Kamath *et al.* 2005; Verdier-Pinard *et al.* 2005).

Les moteurs moléculaires dynéine et kinésine-1 se retrouvent respectivement diminués et augmentés dans la fraction microtubulaire des cellules résistantes. La dynéine est un moteur moléculaire du bout (-) qui participe au mouvement centripète de vésicules membranaires, d'organites et de divers facteurs de signalisation comme le récepteur des glucocorticoïdes (Pratt *et al.* 2006; Gennerich and Vale 2009) ou STAT5B (Phung-Koskas *et al.* 2005). Il a été démontré que la chaîne légère-1 de la dynéine accroît la prolifération cellulaire par l'activation d'une kinase cycline-dépendante (den Hollander and Kumar 2006). Mais il reste à éclaircir si cette signalisation pourrait indirectement contrôler la dynamique microtubulaire et contribuer à la résistance au Taxol. A l'inverse, la kinésine-1 (KIF5B) est un moteur moléculaire du bout (+), impliqué dans le trafic vésiculaire (Hirokawa *et al.* 2009). Il a été démontré au laboratoire que la kinésine-1 stimulait la dynamique microtubulaire en permettant l'activation de la kinase JNK (Marceiller *et al.* 2005; Daire *et al.* 2009). De manière intéressante, il a été suggéré que d'autres kinésines, à savoir KIF5A, KIF1A, KIFC1 et KIFC3, pouvaient moduler la résistance au docétaxel dans les cellules MDA-MB 231 (De *et al.* 2009), mais les mécanismes par lesquels elles participent à la résistance aux taxanes reste à déterminer.

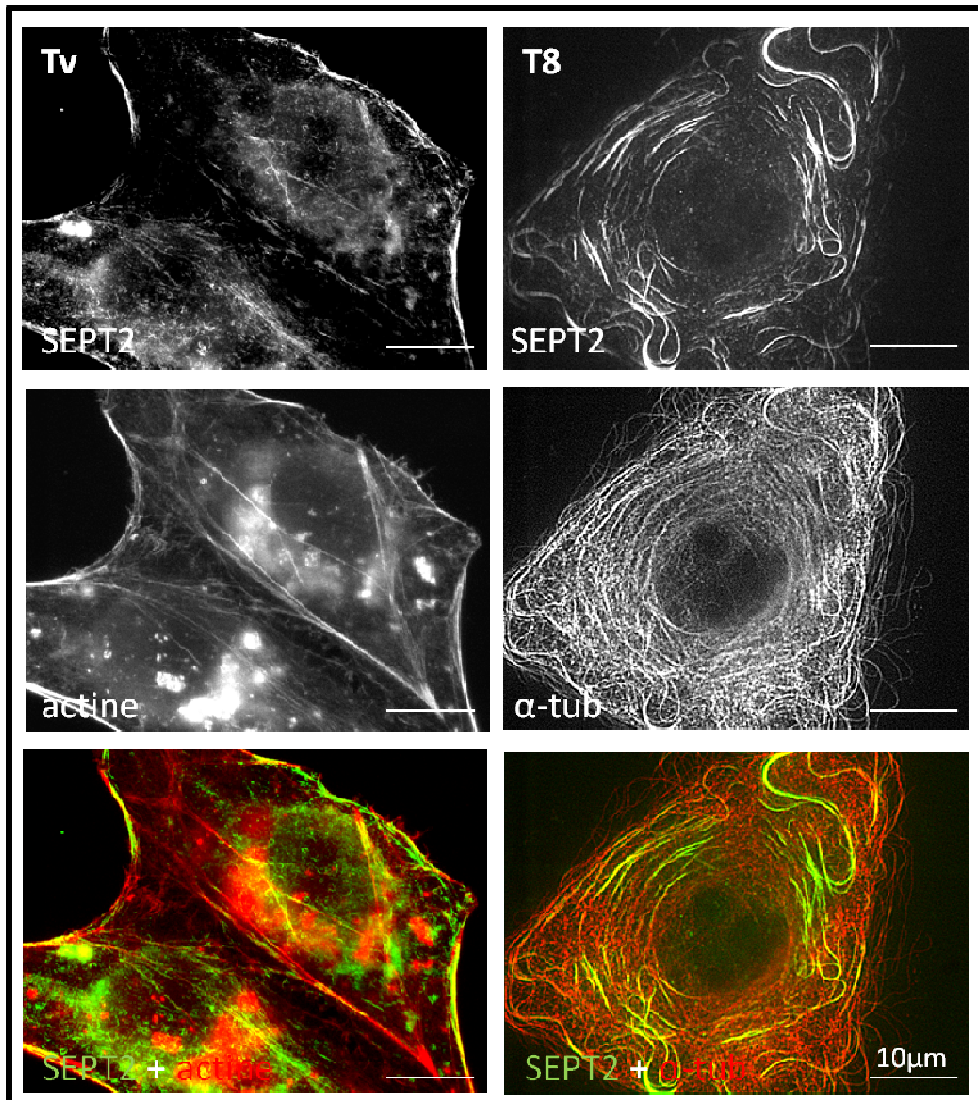
De même, plusieurs septines, à savoir SEPT2, SEPT8, SEPT9 et SEPT11, sont retrouvées surexprimées et davantage recrutées sur les microtubules des cellules résistantes. Les septines sont principalement impliquées dans la cytokinèse, jouant un rôle de barrière de diffusion pour séparer les protéines et les ARNm entre la cellule mère et la cellule fille (Kinoshita and Noda 2001). Elles sont également impliquées dans l'organisation des cytosquelettes d'actine et de microtubules (Surka *et al.* 2002; Nagata *et al.* 2003) et dans le trafic membranaire (Spiliotis *et al.* 2008). Les septines, en particulier SEPT2, pourraient moduler la dynamique microtubulaire en se liant aux microtubules, en association avec la polyglutamylation de la tubuline (Spiliotis *et al.* 2008), et pourraient ainsi empêcher la liaison de MAP4 aux microtubules (Kremer *et al.* 2005). SEPT11 colocalise avec les microtubules et les filaments d'actine dans plusieurs types cellulaires, et peut former des complexes

avec les autres septines (Hanai *et al.* 2004). Seule une étude a proposé l'implication de SEPT9 dans la résistance aux anticancéreux (Amir and Mabweesh 2007), mais plusieurs montrent une expression anormale des septines dans les cellules cancéreuses. Par exemple, SEPT2, 8, 9 et 11 sont significativement surexprimées dans certains cancers, et leur surexpression est souvent corrélée avec la malignité tumorale et un mauvais pronostic (Sakai *et al.* 2002; Montagna *et al.* 2003; Liu *et al.* 2010b). L'isoforme SEPT9\_v1 semble jouer un rôle particulièrement important dans le cancer du sein, dans lequel il pourrait contribuer au phénotype malin (Gonzalez *et al.* 2007) et être utilisé comme biomarqueur pour identifier une résistance thérapeutique aux agents anti-microtubules (Amir and Mabweesh 2007). Bien qu'elle n'ait pas été détectée sur nos gels 2D, l'expression de SEPT9 et son recrutement sur les microtubules augmentent, comme nous pouvions nous y attendre, dans la lignée cellulaire résistante au Taxol.

Globalement, la quantification des ARNm de chacune des septines impliquées dans la chimiorésistance ne montre une augmentation de régulation transcriptionnelle entre Tv et T8 que pour SEPT11, alors qu'elle montre même une diminution d'environ 20% pour les ARNm de SEPT2 et SEPT8. Cependant, il s'agit de protéines qui présentent de nombreuses isoformes (Russell and Hall 2011) et, comme dans le cas de SEPT2, SEPT8 et SEPT9 (Russell and Hall 2011), des amorces nucléotidiques amplifiant tous les variants laisse penser qu'il y a une diminution (*SEPT2* et *SEPT8*) ou pas de modification d'expression (*SEPT9*) des ARNm, alors que l'analyse précise de certains variants pourrait montrer une régulation importante entre Tv et T8. C'est notamment le cas pour *SEPT9\_v1* qui augmente de 89%, alors que le variant *SEPT9\_v4\** est stable.

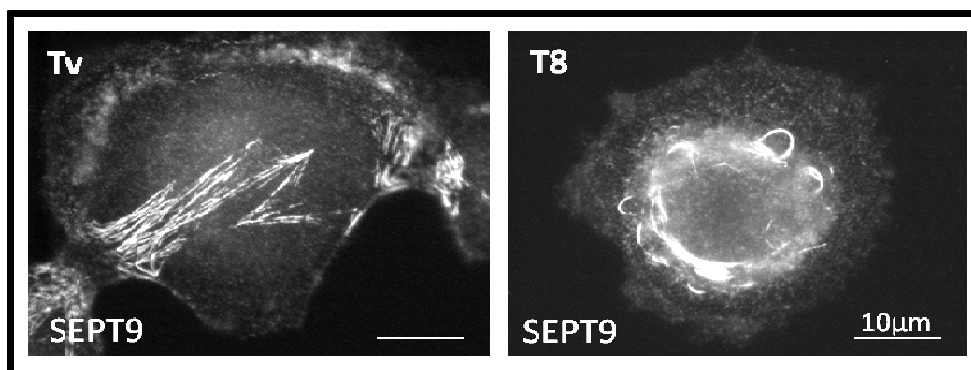
Dans la suite de mon travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'implication des septines dans la chimiorésistance au Taxol et à savoir si cette modification d'expression et de recrutement des septines est à l'origine ou seulement une conséquence de la résistance au Taxol.





**Figure 48 : Localisation subcellulaire différentielle de SEPT2 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (marquage anti-SEPT2 en vert) avec l'actine (marquage anti-phalloïdine en rouge) dans les cellules Tv, ou avec les microtubules (marquage anti- $\alpha$ -tubuline en rouge) dans les cellules T8



**Figure 49 : Localisation subcellulaire différentielle de SEPT9 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Marquage en immunofluorescence de SEPT9 dans les cellules Tv et T8

## **PARTIE III : IMPLICATION DES SEPTINES DANS LA CHIMIORESISTANCE AU TAXOL**

### **V. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES SEPTINES**

#### **V.1. Localisation différentielle des septines dans les cellules sensibles et résistantes**

De nombreuses études ont montré que les septines chez les mammifères étaient localisées, selon les lignées cellulaires, soit au niveau de l'actine, soit au niveau des microtubules (pour revue : Lindsey and Momany 2006). Elle n'a cependant jamais été rapportée dans les cellules MDA-MB 231.

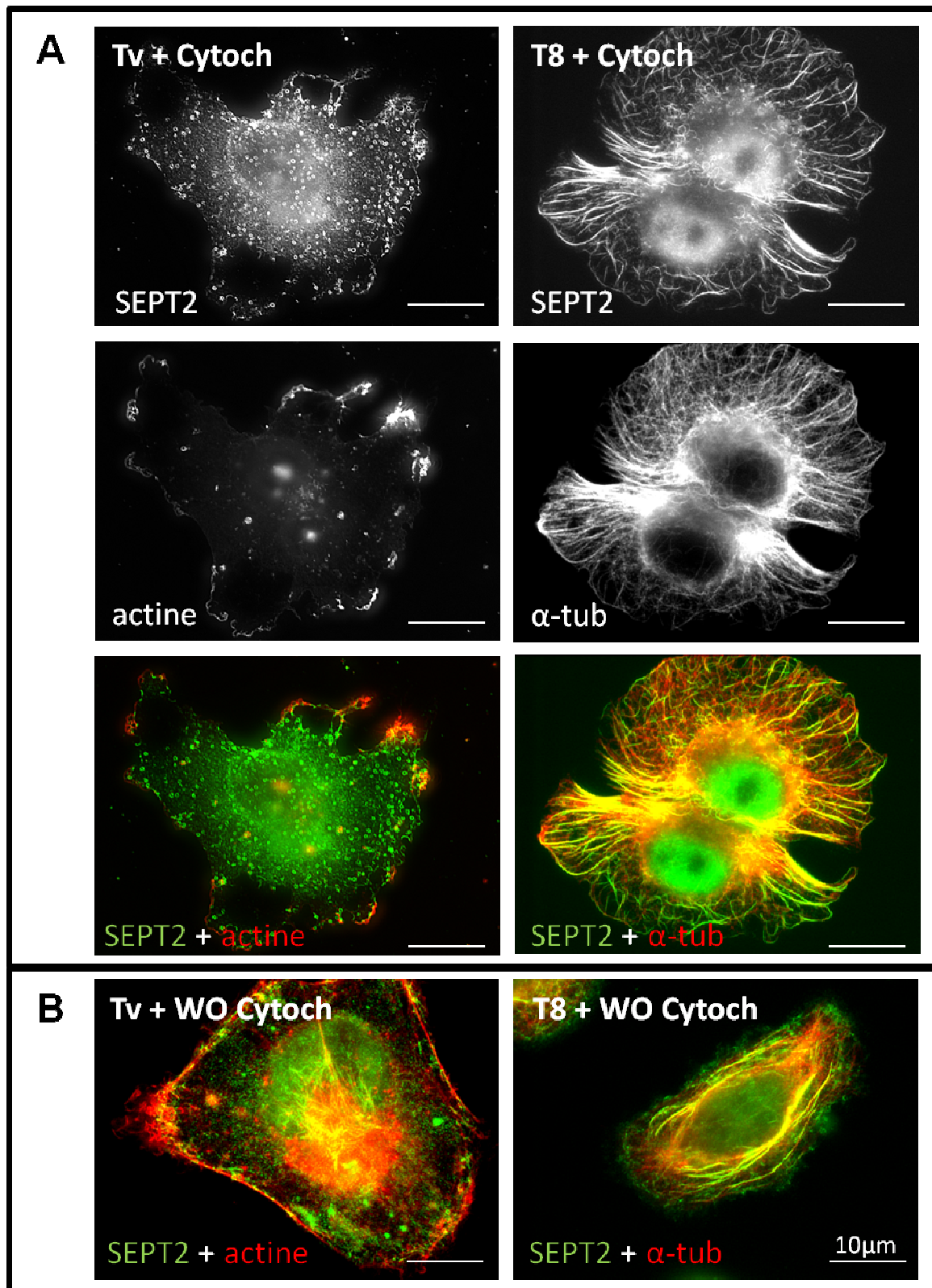
Plusieurs septines ayant été retrouvées, dans notre étude protéomique comparative, différenciellement enrichies dans les fractions microtubulaires de nos cellules sensibles et résistantes au Taxol, nous nous attendions à ce que les septines soient localisées sur les microtubules dans la lignée MDA-MB 231.

Or, dans les cellules Tv sensibles au Taxol, des expériences d'immunofluorescence en double marquage révèlent une association de SEPT2 (Figure 48) et de SEPT9 (Figure 49) avec les filaments d'actine, aussi bien avec l'actine corticale qu'avec les fibres de stress. En revanche, dans les cellules T8 résistantes au Taxol, ces mêmes septines colocalisent avec les faisceaux épais (appelés « bundles ») de microtubules (Figure 48 et Figure 49), en accord avec nos résultats de protéomique. Au sein d'une même lignée cellulaire (MDA-MB 231), les septines peuvent donc présenter une localisation différentielle, qui pourrait être à l'origine ou simplement une conséquence de la chimiorésistance au Taxol.

D'après ces résultats d'immunofluorescence, les septines semblent présentes exclusivement associées à l'actine dans les cellules sensibles Tv. Cependant, dans nos expériences de Western blot, des septines sont retrouvées dans les fractions microtubulaires. Nous ne pouvons pas exclure le fait qu'une faible proportion des septines soit microtubulaire dans les cellules sensibles. Mais notre protocole d'extraction permettant d'extraire les protéines de l'environnement des microtubules, et certaines protéines servant de liaison entre l'actine et les microtubules, il est probable que notre protocole permette également de retrouver certaines protéines associées à l'actine, et notamment les septines dans la fraction microtubulaire des cellules sensibles Tv.

Afin de déterminer si les septines peuvent passer indifféremment de l'actine aux microtubules et inversement dans la lignée MDA-MB 231, nous avons cherché à savoir si une relocalisation des septines était possible lorsqu'on dépolymérise l'un ou l'autre élément de cytosquelette.





**Figure 50 : Organisation des complexes de septines dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8 en présence de cytochalasine B**

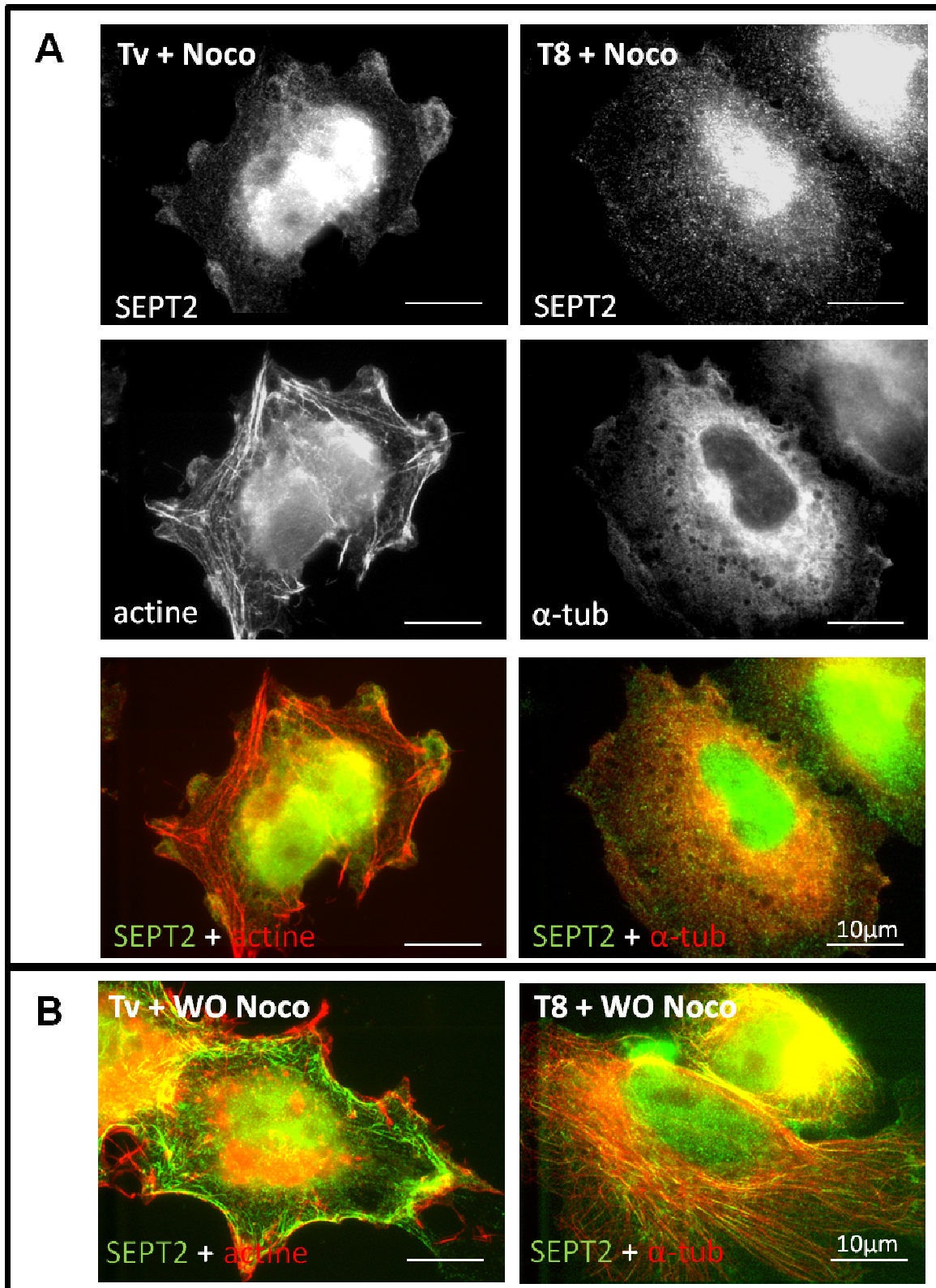
Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (marquage anti-SEPT2 en vert) avec l'actine (marquage anti-phalloïdine en rouge) dans les cellules Tv, ou avec les microtubules (marquage anti- $\alpha$ -tubuline en rouge) dans les cellules T8, **A** : après dépolymérisation des filaments d'actine par traitement des cellules Tv et T8 avec 10 $\mu$ g/mL de cytochalasine B pendant 30min à 37°C, puis **B** : après élimination (Wash-out) de la drogue pendant 30min à 37°C (WO Cytoch)

## V.2. Localisation des septines en absence de filaments d'actine

De façon intéressante, la dépolymérisation de l'actine par un traitement à la cytochalasine B n'entraîne pas une relocalisation des septines sur les microtubules. Dans les cellules Tv, où les septines sont localisées au niveau de l'actine en conditions normales, la perte des filaments d'actine provoque un réarrangement des complexes de septines en anneaux (Figure 50 A).

Dans les cellules T8, où les septines sont localisées au niveau des microtubules (non perturbés par le traitement à la cytochalasine), la perte des filaments d'actine ne provoque pas de réarrangement des septines en anneaux. Il semble même que le recrutement sur les microtubules soit encore plus important (Figure 50 A).

L'élimination de la cytochalasine par des lavages avec du milieu de culture froid et incubation à 37°C pendant 30min avec du milieu chaud, permettant de reformer les filaments d'actine, restaure la compartimentation des septines, au niveau de l'actine dans les cellules Tv alors qu'elles restent toujours localisées au niveau des microtubules dans les cellules T8 (Figure 50 B).



**Figure 51 : Localisation subcellulaire des septines en absence de microtubules dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (marquage anti-SEPT2 en vert) avec l'actine (marquage anti-phalloïdine en rouge) dans les cellules Tv, ou avec les microtubules (marquage anti- $\alpha$ -tubuline en rouge) dans les cellules T8, **A** : après dépolymérisation des microtubules par traitement des cellules Tv et T8 avec 10 $\mu$ M de nocodazole pendant 1h30 à 37°C puis 2h sur la glace, puis **B** : après élimination (Wash-out) de la drogue pendant 30min à 37°C (WO Noco)

## V.1. Localisation des septines en absence de microtubules

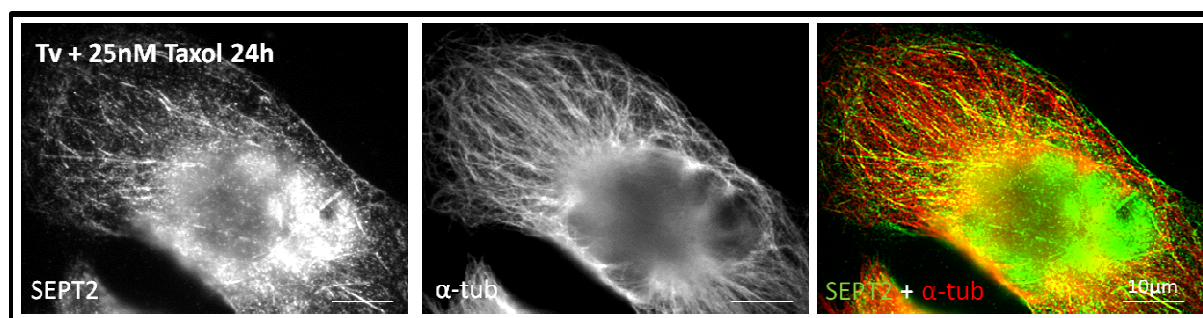
La dépolymérisation des microtubules a été réalisée par un traitement long au nocodazole à 10 $\mu$ M (1h30 à 37°C puis 2h sur la glace), permettant de dépolymériser à la fois les microtubules dynamiques et les microtubules stables.

Dans les cellules T8, où les septines sont associées en conditions normales aux microtubules, la dépolymérisation de ces derniers perturbe leur localisation, les septines apparaissant alors diffuses dans le cytoplasme (Figure 51 A). Il n'y a aucun complexe de septines, ni au niveau des fibres d'actine (qui sont toujours présentes car non perturbées par le traitement par le nocodazole), ni sous forme d'anneaux. De manière surprenante, alors que les septines sont normalement localisées au niveau des fibres d'actine dans les cellules Tv, la dépolymérisation des microtubules entraîne également une perte des complexes de septines qui ne se retrouvent, ni au niveau de l'actine, pourtant intacte, ni sous forme d'anneaux (Figure 51 A). L'élimination du nocodazole, permettant le réassemblage des microtubules, restaure la compartimentation d'origine des septines, sur l'actine dans les cellules sensibles Tv et sur les microtubules dans les cellules résistantes T8 (Figure 51 B).

## V.2. Localisation des septines après traitement au Taxol

Afin de vérifier que la localisation des septines sur les microtubules des cellules résistantes T8 n'était pas due à la seule présence de Taxol, nous avons observé l'effet d'un traitement de 24h à 25nM de Taxol, qui est la concentration de culture des cellules résistantes T8, sur la localisation subcellulaire de SEPT2 dans les cellules sensibles Tv (Figure 52).

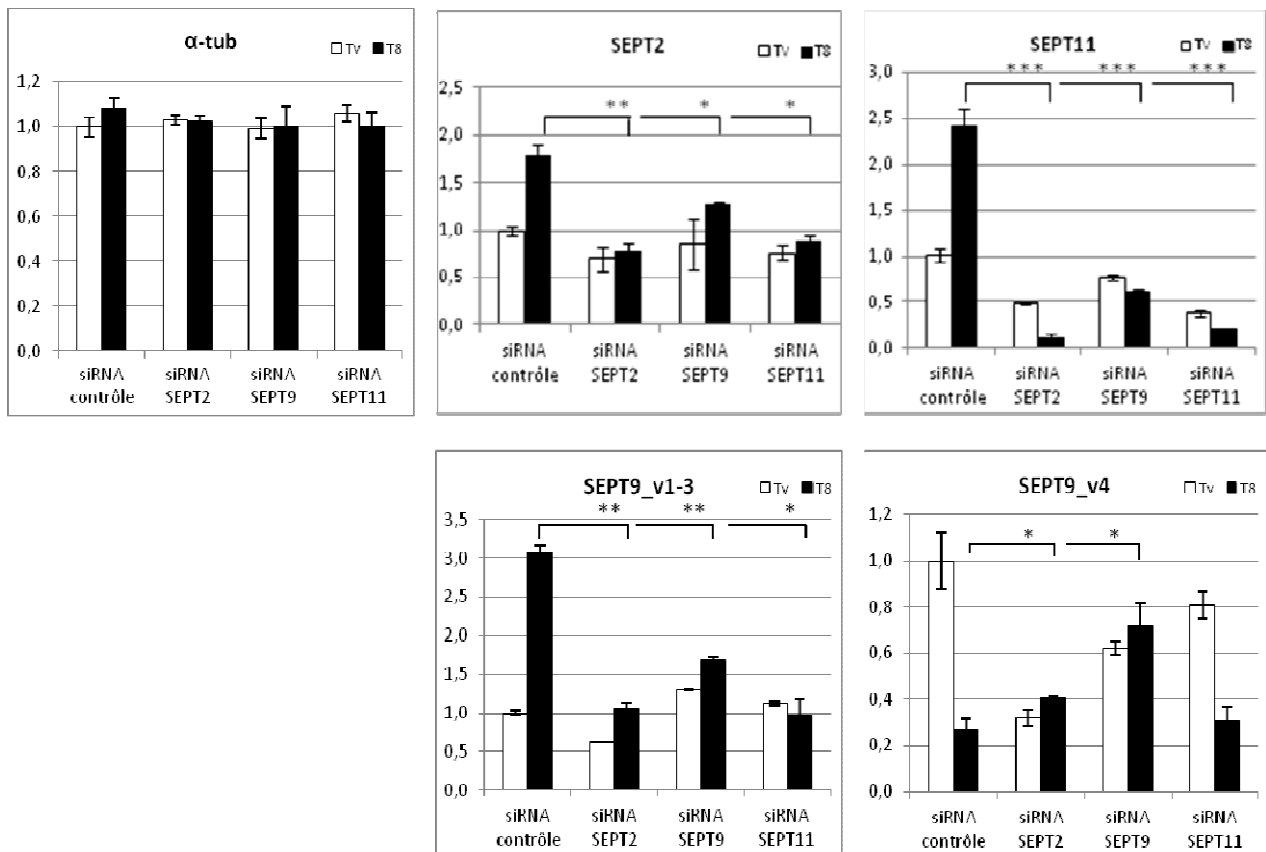
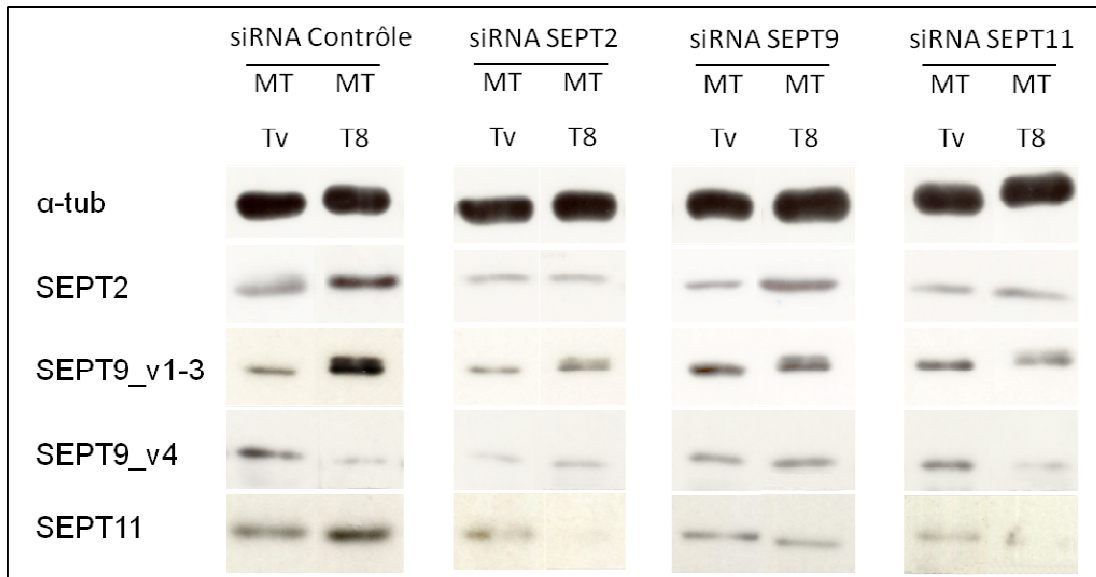
Le double marquage en immunofluorescence de SEPT2 avec l' $\alpha$ -tubuline ne révèle pas ou peu de colocalisation de cette septine avec le réseau de microtubules dans les cellules Tv traitées par du Taxol. Le marquage SEPT2 semble plutôt colocaliser avec l'actine corticale et les fibres de stress, tout comme dans les cellules sensibles Tv non traitées (voir Figure 49).



**Figure 52 : Localisation subcellulaire des septines en présence de Taxol dans les cellules sensibles Tv**

Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (marquage anti-SEPT2 en vert) avec les microtubules (marquage anti- $\alpha$ -tubuline en rouge) dans les cellules Tv après traitement pendant 24h avec 25nM de Taxol





**Figure 53 : Effet de l'inhibition partielle de l'expression d'une septine sur le recrutement sur les microtubules des septines des autres groupes**

Analyse par Western blot du recrutement sur les microtubules des septines dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec un siRNA contrôle (témoin) ou des siRNA de plusieurs septines. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences.

## VI. RESTAURATION DE LA SENSIBILITE AU TAXOL DES CELLULES RESISTANTES PAR INHIBITION PARTIELLE DES SEPTINES

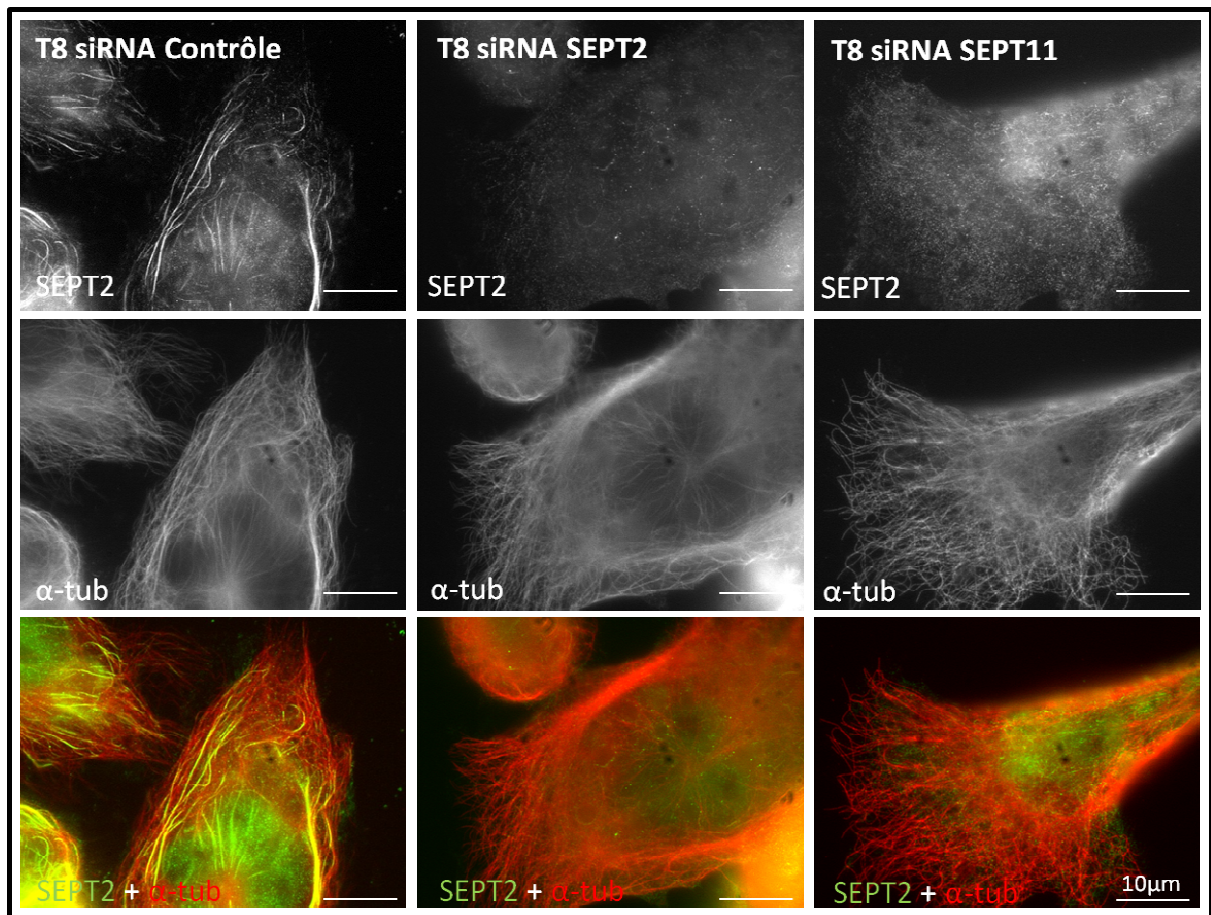
Même si le mécanisme reste encore incompris, la surexpression (Figure 46) et la localisation différentielle des septines entre les cellules sensibles et résistantes (Figure 51) semblent être les premiers éléments reliant les septines à la chimiorésistance au Taxol des cellules MDA-MB 231.

### VI.1. Impact de l'inhibition partielle d'une septine sur le niveau d'expression et de recrutement des autres septines

Afin de déterminer si les septines sont non seulement impliquées mais à l'origine de la chimiorésistance des cellules MDA-MB 231 T8, nous avons étudié l'impact d'une inhibition partielle de différentes septines sur la sensibilité au Taxol des cellules résistantes.

Les septines sont associées en complexes, constitués de septines provenant de trois groupes différents pour former des trimères, ou des quatre groupes existants pour former des tétramères (voir Introduction, Partie II : Les Septines, I.3.1.3 Assemblage et Composition variable des hétéro-oligomères). Les septines étant en partie interchangeables au sein d'un même groupe (Sellin *et al.* 2011), nous avons choisi de n'étudier l'inhibition d'expression que d'une seule septine de chaque groupe, les siRNA utilisés étant dirigés contre SEPT2, SEPT9 et SEPT11 qui appartiennent respectivement au groupe 2, 3 et 6 (Figure 15). SEPT8, retrouvée surexprimée et recrutée sur les microtubules des T8 dans notre étude protéomique comparative, fait partie du groupe 6 au même titre que SEPT11, qui devrait donc répondre de la même manière aux expériences d'inhibition par siRNA. Ces expériences ont été réalisées à la fois sur les cellules sensibles Tv et les cellules résistantes T8, mais les septines étant surexprimées et enrichies dans les fractions microtubulaires des T8, c'est sur ces cellules résistantes qu'un effet est attendu.

Dans les fractions microtubulaires des cellules T8, la transfection du siRNA SEPT2 entraîne non seulement une inhibition d'environ 60% de l'expression de SEPT2 et de son recrutement consécutif sur les microtubules, mais également de ceux de SEPT9\_v1-3 (~65%) et de SEPT11 (~95%). De même, le siRNA SEPT9 inhibe d'environ 45% l'expression et le recrutement de SEPT9\_v1-3, mais aussi d'environ 30% et 75% ceux de SEPT2 et de SEPT11. Enfin, le siRNA SEPT11 diminue considérablement l'expression et le recrutement de SEPT11 (~90%) et réduit également ceux de SEPT2 (~50%) et de SEPT9\_v1-3 (~70%) (Figure 53). Parallèlement, des expériences d'immunofluorescence ont également mis en évidence la diminution du recrutement de SEPT2 et donc son absence de localisation microtubulaire après inhibition partielle de l'expression de SEPT2 et de SEPT11 dans les cellules T8 (Figure 54).



**Figure 54 : Absence de localisation microtubulaire de SEPT2 par inhibition partielle de SEPT2 et SEPT11 par siRNA dans les cellules résistantes T8**

Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (marquage anti-SEPT2 en vert) avec les microtubules (marquage anti- $\alpha$ -tubuline en rouge) dans les cellules T8, après transfection de siRNA Contrôle et des siRNA SEPT2 et SEPT11 pendant 72h

L'absence d'une septine semble donc perturber la stabilité des complexes, empêchant leur recrutement sur les microtubules des cellules T8. Ceci pose la question d'une réelle interchangeabilité des septines au sein d'un même groupe.

## VI.2. Impact de l'inhibition partielle des septines sur la sensibilité au Taxol des cellules sensibles et résistantes

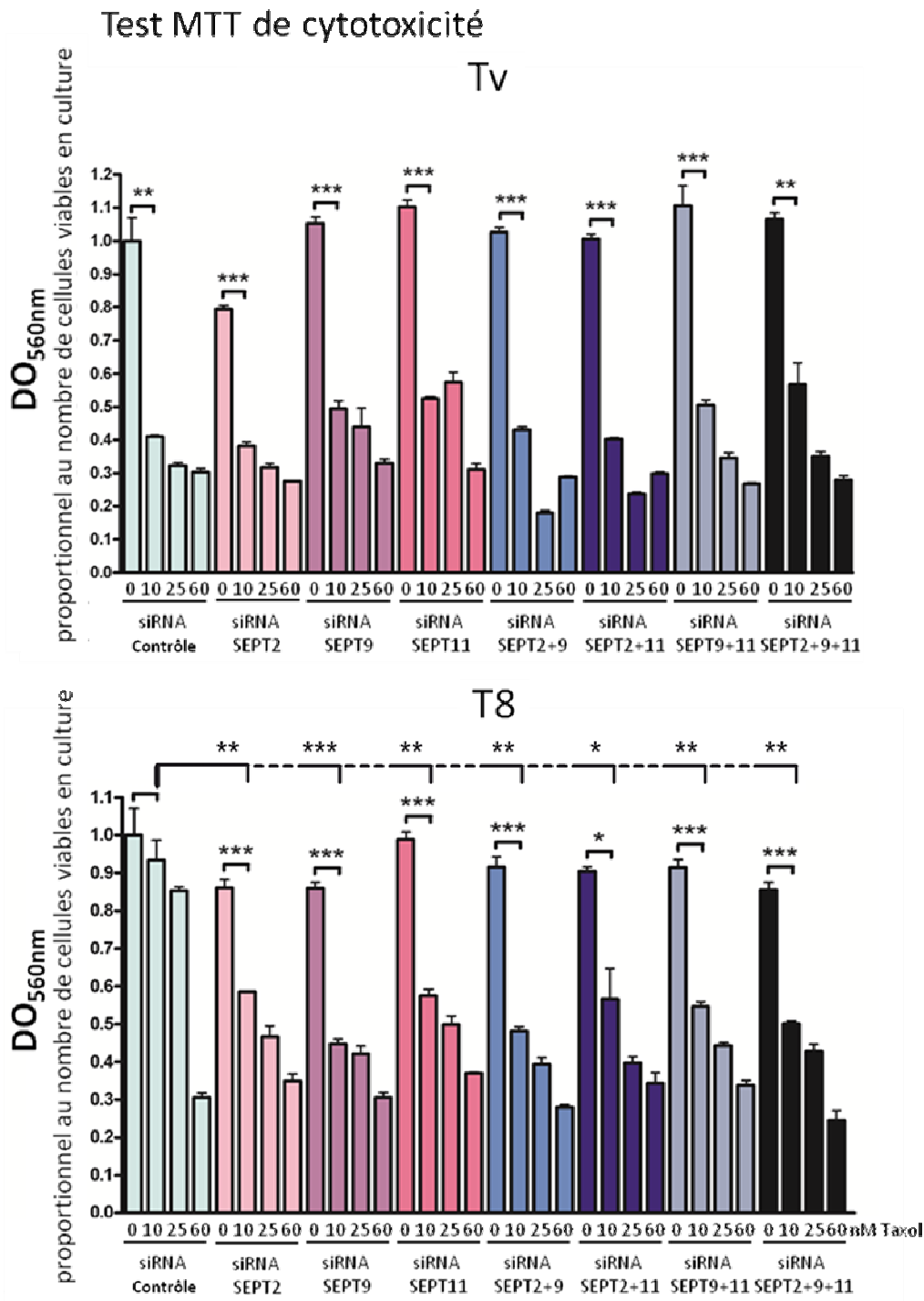
Afin d'étudier l'implication des septines dans la chimiorésistance au Taxol des cellules MDA-MB 231, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité au Taxol après inhibition partielle par siRNA de trois septines, SEPT2, SEPT9 et SEPT11, dans les cellules sensibles et résistantes (Figure 55). Après 24h de transfection avec des siRNA SEPT2, 9 et 11, seuls ou en combinaison, les cellules Tv et T8 ont été traitées avec quatre concentrations différentes de Taxol, 0nM (les cellules Tv étant cultivées en absence de Taxol), 10nM (proche de l'IC<sub>50</sub> des cellules Tv), 25nM (concentration de culture des cellules T8) et 60nM (IC<sub>50</sub> des cellules T8). Après 48h de traitement au Taxol (soit 72h après le début de la transfection par le siRNA), le test MTT de cytotoxicité est réalisé.

Les résultats obtenus avec le siRNA contrôle sont en accord avec le test MTT effectué sur des cellules non transfectées (voir Figure 39), à savoir qu'une baisse de 60% de la viabilité cellulaire est observée chez les cellules sensibles Tv dès 10nM de Taxol, alors qu'elle n'est diminuée que de 7% chez les cellules résistantes à cette concentration. Les cellules résistantes T8 ne présentent une telle baisse de viabilité cellulaire qu'à partir de 60nM (Figure 55), comme attendu (voir Figure 39).

Alors que l'inhibition partielle des septines n'a pas d'effet sur la sensibilité des cellules Tv (qui expriment moins les septines), elle restaure la sensibilité au Taxol des cellules résistantes. De manière particulièrement intéressante, une baisse de la viabilité cellulaire de 35% à 50% est observée dès 10nM de Taxol après transfection des différents siRNA, seuls ou combinés.

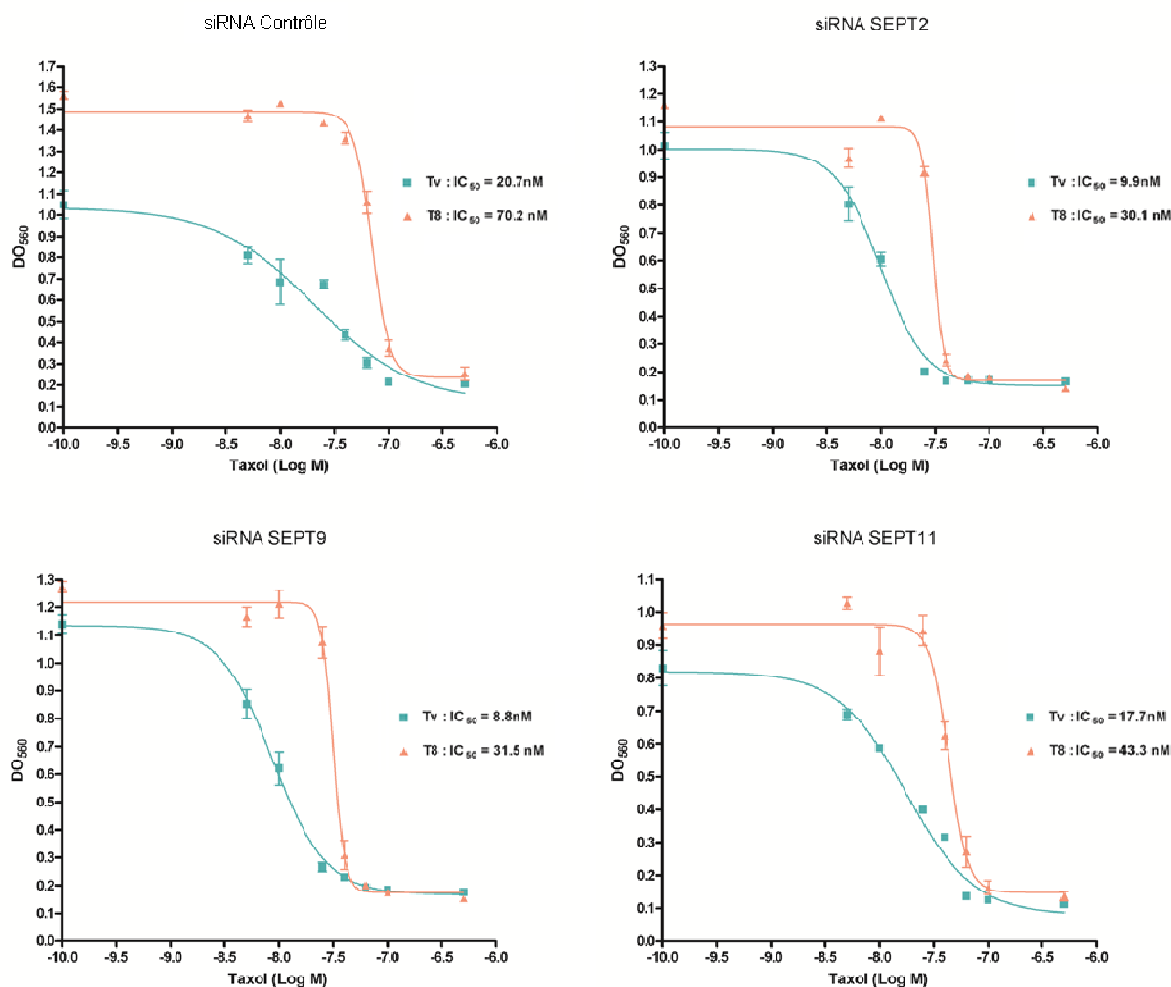
Les IC<sub>50</sub> de Taxol mesurées sur les cellules T8 après inhibition partielle de l'expression des septines ont par la suite été déterminées afin de mesurer plus précisément la restauration de la sensibilité au Taxol des cellules résistantes (Figure 56). Bien que les IC<sub>50</sub> de Taxol déterminées chez les cellules Tv et T8 soient légèrement plus élevées avec le siRNA contrôle que celles mesurées chez des cellules non transfectées (voir Figure 39), les valeurs obtenues avec les cellules Tv traitées avec les différents siRNA SEPT restent sensiblement les mêmes, variant de 8,8 à 17,7nM de Taxol. En revanche, nos résultats montrent une diminution importante de l'IC<sub>50</sub> de Taxol chez les cellules T8 après inhibition partielle de l'expression des trois septines, avec des IC<sub>50</sub> variant de 30,1 à 43,3nM selon les siRNA SEPT, contre 70,2nM de Taxol pour le siRNA contrôle, soit une diminution d'environ 40 à 60% de la résistance au Taxol des cellules T8, et une diminution du ratio des IC<sub>50</sub> de Taxol des lignées Tv et T8 entre 2,4 et 3,6 contre 12,6 en conditions normales (voir Figure 39).





**Figure 55 : Effet de l'inhibition partielle des septines par siRNA sur la sensibilité au Taxol de cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Les cellules Tv et T8 sont transfectées avec le siRNA Contrôle ou les siRNA SEPT2, SEPT9 et SEPT11, seuls ou en combinaison, et traitées le lendemain pour 48h avec quatre concentrations de Taxol correspondant aux conditions de culture des cellules Tv et T8 ou à leur IC<sub>50</sub>, avant d'effectuer un test MTT de cytotoxicité. Chaque valeur correspond à la moyenne ± s.e.m. de trois mesures. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à p<0,05, p<0,01 et p<0,001 (test t de Student).



**Figure 56 : Cytotoxicité comparée du Taxol dans les cellules MDA-MB Tv et T8 après inhibition partielle des septines par siRNA**

Test MTT de cytotoxicité, réalisé après 48h d'exposition à des concentrations croissantes de Taxol, et 72h après transfection par des siRNA SEPT2/9/11. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de trois mesures.

## VII.DISCUSSION

Nos résultats mettent en évidence une localisation différentielle des septines, associées à l'actine chez les Tv et aux microtubules chez les T8, qui est perturbée lors de la dépolymérisation de l'un ou l'autre élément de cytosquelette. Cette localisation des septines sur les microtubules des cellules T8 n'est pas due à la seule présence de Taxol dans leur milieu de culture.

La dépolymérisation de l'actine provoque une désorganisation des filaments et un réassemblage des septines en anneaux dans les cellules sensibles, ce qui a déjà été mis en évidence dans plusieurs études (Xie *et al.* 1999; Oegema *et al.* 2000; Kinoshita *et al.* 2002). Ces anneaux de septines y sont considérés comme un mode de stockage ou un défaut d'assemblage des septines en absence d'actine.

De même, l'organisation filamentaire et la colocalisation des septines avec le cytosquelette est totalement abolie, aussi bien chez les Tv que chez les T8, lorsque les microtubules sont dépolymérisés, indiquant que ces derniers sont nécessaires à la formation des filaments de septines. Une perte partielle (et non totale) des filaments de SEPT9 (appelée MSF-A) a déjà été mise en évidence après dépolymérisation des microtubules par un traitement court au nocodazole à 10 $\mu$ M dans les cellules HeLa (Surka *et al.* 2002). Or, un traitement court au nocodazole dépolymérise les microtubules dynamiques sans dépolymériser les microtubules stables, ce qui pourrait expliquer la perte partielle des filaments de SEPT9 qu'ils ont observé. En revanche, des études d'immunoprécipitation réalisées avec SEPT5 dans des plaquettes démontrent qu'un traitement au nocodazole n'affecte pas la stabilité des complexes de septines (complexes SEPT5/6/7/9 dans les cellules plaquettaires) (Martinez *et al.* 2006). Il semble néanmoins, d'après notre étude, que l'absence de microtubules empêche la compartimentation des septines sur le cytosquelette, qui restent sous forme de complexes solubles non associés en structures d'ordre supérieur, aussi bien dans les cellules sensibles que résistantes.

Par ailleurs, aucune étude n'a à ce jour étudié l'impact d'un traitement au Taxol sur la localisation des septines lorsque celles-ci sont habituellement localisées au niveau des fibres d'actine. Mais la localisation des septines sur les microtubules des cellules T8 n'est pas une conséquence d'un effet du Taxol puisque SEPT2 demeure localisée sur l'actine après traitement au Taxol des cellules Tv.

**D'après nos résultats de Western blot et d'immunofluorescence, l'inhibition partielle d'une septine par siRNA semble avoir un impact sur le recrutement sur les microtubules des autres septines.**

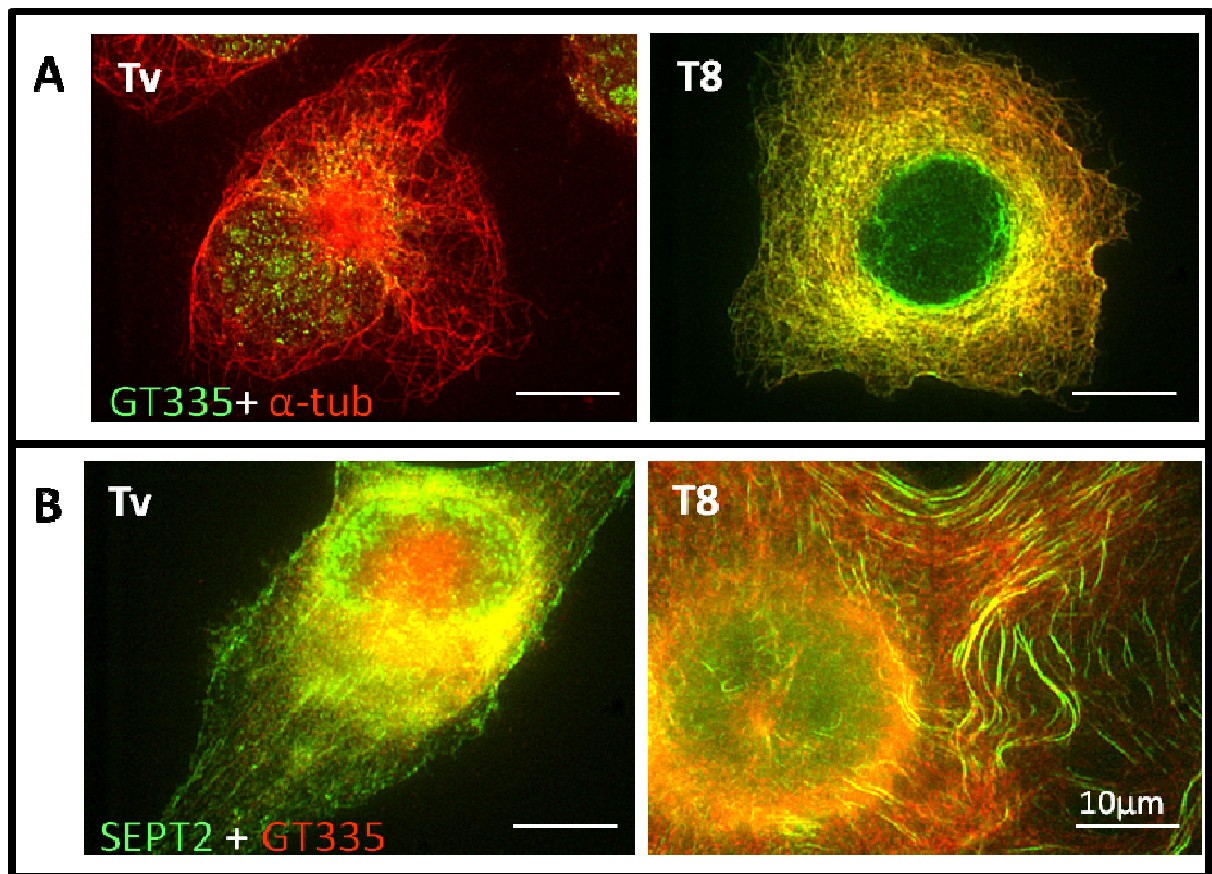
Les septines sont des protéines qui s'assemblent en filaments, comprenant des oligomères provenant de quatre sous-groupes qui peuvent se substituer les uns aux autres au sein d'un même groupe (Longtine *et al.* 1996; Kinoshita 2003a; Cao *et al.* 2009). Or toutes les septines d'un groupe ne sont pas nécessairement exprimées dans les cellules MDA-MB 231, plusieurs d'entre elles étant spécifiques de certains tissus. En effet, parmi les septines du groupe 2 (SEPT1/2/4/5), seules SEPT1 et SEPT2 semblent ubiquitaires, SEPT4 étant spécifiquement retrouvée au niveau du cerveau, des testicules, de l'œil et des lymphocytes, tout comme SEPT5 qui est retrouvée dans le cerveau, l'œil et les plaquettes (Peterson and Petty 2010). L'absence de filaments ou de complexes de septines observée en immunofluorescence lors de l'inhibition partielle d'une septine par siRNA peut provenir de l'absence d'expression de septines (compensatrices) du même groupe mais aussi soulève la possibilité que les septines d'un même groupe ne peuvent pas forcément compenser l'inhibition d'une septine en s'intégrant dans un complexe à sa place. Il a déjà été démontré dans plusieurs études que l'inhibition par siRNA de SEPT2 et de SEPT7 provoque une dégradation associée d'autres septines (Kinoshita *et al.* 2002; Kremer *et al.* 2005; Tooley *et al.* 2009; Estey *et al.* 2011). Ainsi, nos résultats suggèrent que les complexes de septines présents dans les cellules MDA-MB Tv et T8 pourraient se

composer de SEPT2 (groupe 2), SEPT8 ou SEPT11 (groupe 6) et de SEPT9 (groupe 3), en plus de SEPT7, seule septine du groupe 7 qui devrait donc être présente dans tous les complexes. Nous n'avons pas déterminé dans cette étude la composition exacte des complexes de septines présents dans nos cellules ainsi que leur régulation. Nous ne pouvons donc pas affirmer que les septines que nous retrouvons appartiennent aux mêmes hétéropolymères. Il serait intéressant de vérifier, d'une part, le niveau d'expression de SEPT7 dans les fractions microtubulaires des cellules Tv et T8 et l'impact de son inhibition sur l'expression des autres septines, et d'autre part, la présence et le niveau d'expression des autres septines dans nos cellules.

**Enfin, la réversion du phénotype chimiorésistant suite à l'inhibition partielle des septines dans nos cellules T8 montre non seulement que ces protéines sont impliquées mais qu'elles pourraient également être à l'origine du phénomène de résistance au Taxol des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231.**

L'hypothèse d'une implication de SEPT9\_v1 dans la résistance aux agents anti-microtubulaires a déjà été émise, étant donné la surexpression de SEPT9 dans certains cancers (Russell and Hall 2005; Amir and Mabjeesh 2007). Il a même été suggéré que l'expression de SEPT9\_v1 dans des tumeurs pourrait être considérée comme un biomarqueur de résistance aux agents anti-microtubulaires (Amir and Mabjeesh 2007), mais aucun mécanisme n'a été proposé. Une autre étude a montré, par l'inhibition de l'expression de SEPT9\_v1 (en ciblant le locus *SEPT9*), une réversion du phénotype tumorigène (inhibition de la prolifération cellulaire, diminution de l'invasion en présence d'un chimioattractant et altération de la motilité cellulaire), suggérant que la dérégulation de l'expression de SEPT9 pouvait affecter la division cellulaire en altérant les microtubules (Gonzalez *et al.* 2007), mais là encore sans suggérer d'implication dans la chimiorésistance.

Puis, sachant que les microtubules présentent des modifications post-traductionnelles ayant un impact dans de nombreuses voies de signalisation, nous avons par la suite cherché à savoir si certaines de ces modifications étaient impliquées dans le recrutement des septines sur les polymères de tubuline dans les cellules résistantes.



**Figure 57 : Recrutement de SEPT2 sur les microtubules polyglutamylés des cellules résistantes T8**

**A** : Double marquage en immunofluorescence de la tubuline-polyglutamylée (marquage anti-GT335 en vert) avec l' $\alpha$ -tubuline (marquage anti- $\alpha$ -tubuline en rouge) dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8. **B** : Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (marquage anti-SEPT2 en vert) avec la tubuline-polyglutamylée (marquage anti-GT335 en rouge) dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8.

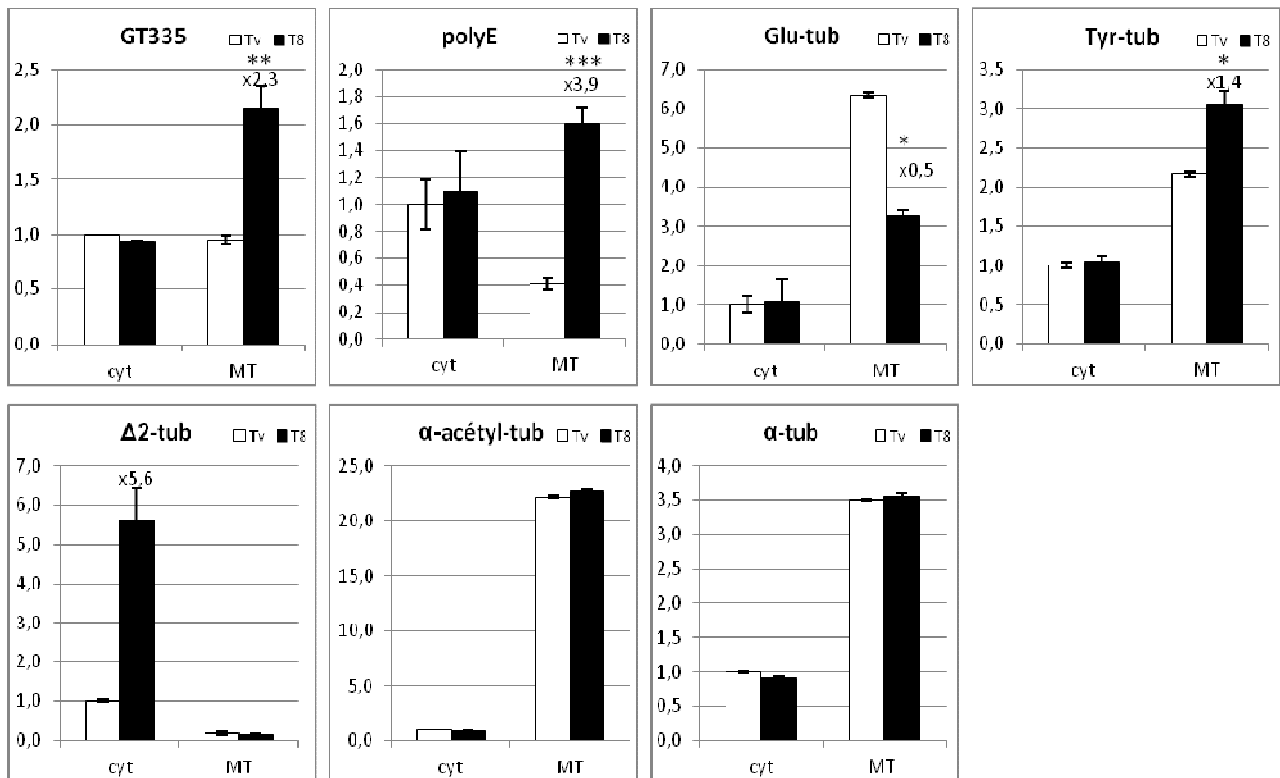
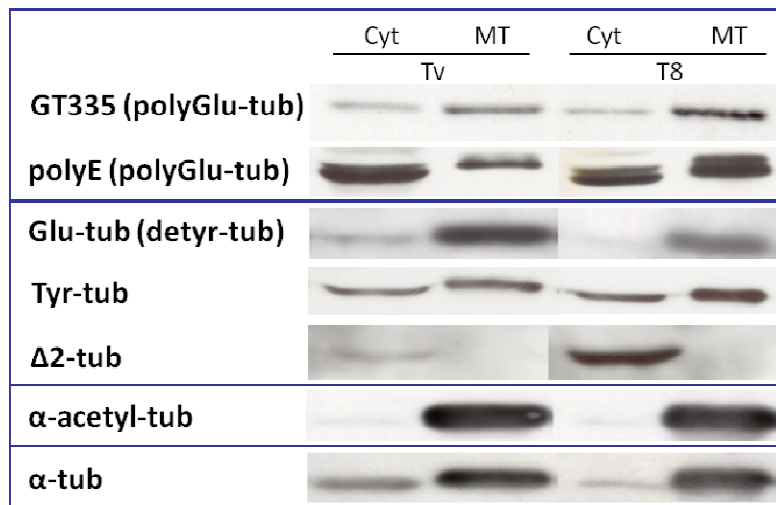
## **PARTIE IV : SEPTINES ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TUBULINE : DEUX NOUVEAUX ACTEURS DE LA CHIMIORESISTANCE ?**

### **I. RECRUTEMENT DE SEPT2 SUR LES MICROTUBULES POLYGLUTAMYLES**

La polyglutamylation correspond à l'ajout d'1 à plusieurs résidus glutamate en chaîne latérale de la tubuline. Sachant que les septines, dans leur rôle dans le transport vésiculaire, sont associées aux microtubules polyglutamylés (Spiliotis *et al.* 2008), il semblait nécessaire de vérifier l'implication de cette modification post-traductionnelle dans le recrutement de ces protéines sur les microtubules des cellules résistantes T8.

Dans un premier temps, nous avons vérifié par un marquage en immunofluorescence la proportion de microtubules polyglutamylés dans les cellules sensibles et résistantes. Pour cela, un double marquage a été réalisé en utilisant un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline et l'anticorps monoclonal GT335, qui reconnaît spécifiquement le branchement d'un résidu glutamate en chaîne latérale de l' $\alpha$ - ou de la  $\beta$ -tubuline (Wolff *et al.* 1992). Et en effet, les cellules sensibles Tv s'avèrent très peu polyglutamylées, alors que les microtubules des cellules résistantes T8 semblent hautement polyglutamylés (Figure 57 A).

De plus, SEPT2 colocalise partiellement avec les microtubules polyglutamylés dans les cellules résistantes (Figure 57 B), indiquant donc une potentielle implication de cette modification post-traductionnelle dans le recrutement des septines sur les microtubules.



**Figure 58 : Niveaux d'accumulation des modifications post-traductionnelles de tubuline dans les fractions cytosoliques et microtubulaires des cellules Tv et T8**

Analyse par Western blot de la quantité de tubuline polyglutamylée (GT335 et polyE), glutamylée (glu-tub, ou détyr-tub), tyrosinée (tyr-tub), delta2 ( $\Delta$ 2-tub) et acétylée ( $\alpha$ -acétyl-tub) dans les fractions cytosoliques (cyt) et microtubulaires (MT) des cellules Tv et T8. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, et les fractions cytosoliques au même volume que les microtubules, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

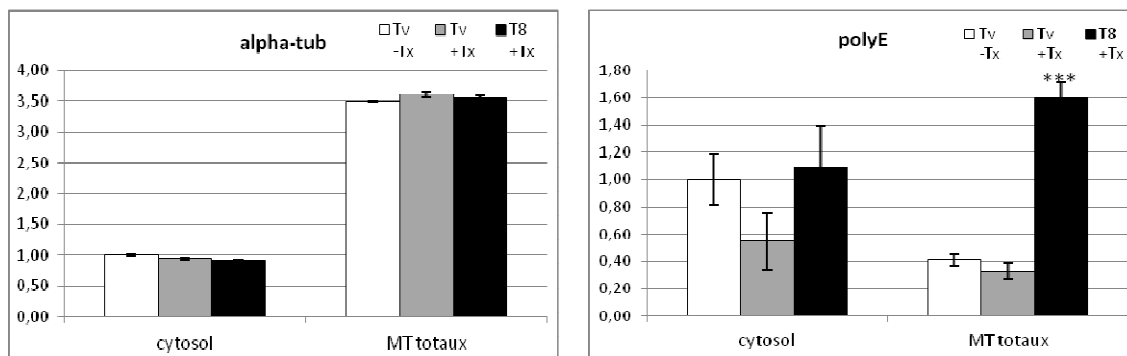
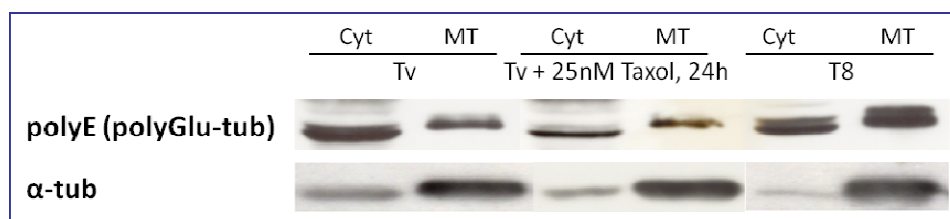
## II. NIVEAU D'ACCUMULATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TUBULINE SUR LES MICROTUBULES DES CELLULES RESISTANTES

Différentes modifications post-traductionnelles, fréquemment rencontrées au niveau des microtubules, ont été analysées par Western blot sur des extraits cytosoliques et microtubulaires des cellules sensibles Tv et résistantes T8. En ce qui concerne la polyglutamylation, deux anticorps différents ont été utilisés : un qui reconnaît spécifiquement une chaîne glutamylée de la tubuline dès son branchement (GT335) et un autre qui reconnaît les chaînes polyglutamylées comportant un minimum de trois résidus (polyE) (voir Matériels et Méthodes, IV.5 Immunomarquage, Figure 34).

Les immunoblots confirment que les microtubules des cellules résistantes T8 possèdent de nombreuses chaînes latérales polyglutamylées (visualisées avec GT335), ce qui n'est pas le cas des cellules sensibles Tv (Figure 58). De plus, il semble que le nombre de résidus glutamate branchés en chaîne latérale de la tubuline de la fraction microtubulaire des cellules résistantes soit majoritairement supérieur à trois, au vue de la quantité importante de microtubules reconnus par l'anticorps polyE dans les cellules T8. L'analyse du niveau d'accumulation de tubuline polyglutamylée dans les cellules sensibles Tv après un traitement de 24h à 25nM de Taxol, correspondant à la concentration de culture des cellules résistantes T8, révèle une quantité de tubuline à longues chaînes latérales polyglutamylées (visualisée avec polyE) identique à celle observée chez les cellules sensibles Tv non traitées par le Taxol (Figure 59). L'augmentation des chaînes latérales polyglutamylées n'est donc pas une conséquence directe de la présence du Taxol dans le milieu de culture mais provient bien d'un mécanisme progressif d'adaptation pour contrer l'effet de cette molécule.

L'analyse d'autres modifications post-traductionnelles de tubuline (Figure 58) met également en évidence une diminution importante de la glutamylation (donc de la détyrosination) de l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline dans les microtubules des cellules T8. Cette baisse de la glutamylation dans les microtubules des cellules T8 résulte d'une augmentation de la tyrosination (Tyr-tub) de tubuline, et non d'une incorporation plus importante de  $\Delta 2$ -tubuline (tubuline détyrosinée puis déglutamylée non re-tyrosinable), présente dans la fraction cytosolique soluble et absente des fractions microtubulaires. En revanche, il n'y a pas de modification du niveau d'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline entre les cellules sensibles et résistantes.





**Figure 59 : Niveaux d'accumulation de tubuline polyglutamylée dans les fractions cytosoliques et microtubulaires des cellules Tv, Tv traitées au Taxol et T8**

Analyse par Western blot de la quantité de tubuline polyglutamylée (polyE) dans les fractions cytosoliques (Cyt) et microtubulaires (MT) des cellules Tv, Tv traitées pendant 24h avec 25nM de Taxol, et T8 (cultivées en permanence en présence de 25nM de Taxol). Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, et les fractions cytosoliques au même volume que les microtubules, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

**Tableau XXXII : Variation des Ct moyens des gènes d'enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline chez les cellules sensibles et résistantes**

Gène	Ct <sub>moy</sub> chez les Tv	Ct <sub>moy</sub> chez les T8
<i>TLL1</i>	31,95 $\pm$ 0,89	32,00 $\pm$ 1,38
<i>TLL2</i>	-	-
<i>TLL3</i>	31,73 $\pm$ 0,85	31,73 $\pm$ 0,94
<i>TLL4</i>	27,01 $\pm$ 0,49	27,37 $\pm$ 0,5
<i>TLL5</i>	25,07 $\pm$ 0,9	25,04 $\pm$ 0,6
<i>TLL6</i>	38,43 $\pm$ 1,61	41,08 $\pm$ 1,41
<i>TLL7</i>	30,10 $\pm$ 0,84	30,26 $\pm$ 0,53
<i>TLL8</i>	-	-
<i>TLL9</i>	-	-
<i>TLL10</i>	-	-
<i>TLL11</i>	29,60 $\pm$ 0,71	31,10 $\pm$ 1,01
<i>TLL12</i>	26,17 $\pm$ 1,88	27,47 $\pm$ 0,69
<i>TLL13</i>	31,76 $\pm$ 0,64	32,48 $\pm$ 0,86
<i>TLL</i>	26,41 $\pm$ 0,51	26,05 $\pm$ 0,90
<i>CCP1</i>	26,45 $\pm$ 0,79	26,04 $\pm$ 0,45
<i>CCP4</i>	-	-
<i>CCP5</i>	28,94 $\pm$ 0,37	28,88 $\pm$ 0,69

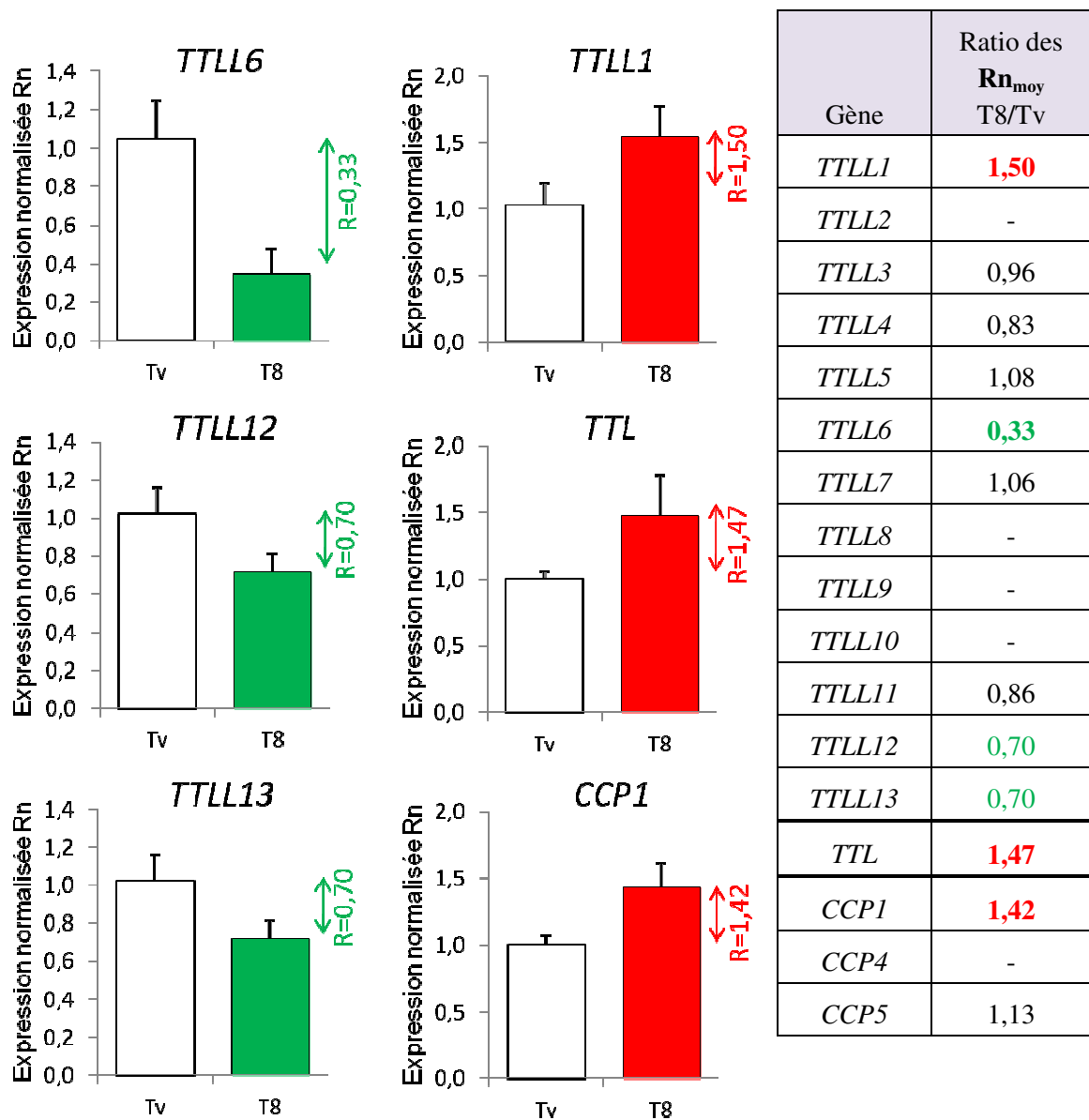
### III. EXPRESSION RELATIVE DES GENES CODANT CERTAINES ENZYMES RESPONSABLES DU NIVEAU DE POLYGLUTAMYLATION DE LA TUBULINE DANS LES CELLULES SENSIBLES ET RESISTANTES

La polyglutamylation et le cycle de tyrosination/détyrosination de la tubuline étant largement modifiés dans les microtubules des cellules T8 comparativement aux cellules Tv, l'expression relative des gènes codant les enzymes responsables du niveau final d'accumulation de ces différentes modifications post-traductionnelles dans les microtubules ont été analysées par PCR quantitative en temps réel.

Comme pour l'analyse de l'expression en ARNm des septines, trois extractions indépendantes d'ARN totaux ont été réalisées, et chaque couple d'amorces a été volontairement désigné de façon à amplifier spécifiquement chaque gène cible, mais aussi tous les variants connus d'une même protéine. Ainsi, nous avons analysé l'expression de 13 polyglutamylases (*TLL1* à *13*), de la tubuline tyrosine ligase (*TTL*) et de 3 déglutamylases (*CCP1*, 4 et 5).

Aucun produit d'amplification n'a été obtenu pour les gènes *TLL2*, 8, 9, 10 et *CCP4* suggérant que ces gènes ne sont pas exprimés dans notre système biologique. Par contre, cette étude a mis en évidence une augmentation significative de l'expression relative (Rn) des gènes codant *TTL*, *TLL1*, *CCP1* et *CCP5*, respectivement de 47, 50, 42 et 13% chez les cellules résistantes T8 par rapport aux cellules sensibles Tv (Figure 60). Par ailleurs, une diminution significative de l'expression des gènes codant *TLL6* et *TLL13* est observée chez les T8. Enfin, l'expression de trois gènes (*TLL3*, 5 et 7) est restée stable au cours de l'acquisition de la résistance au Taxol de nos cellules (Figure 60).

Par ailleurs, l'enzyme qui présente la plus forte baisse d'expression génique (*TLL6*) s'avère être très peu exprimée dans notre système biologique. Les Ct obtenus pour ce gène cible (entre 37 et 42) (Tableau XXXII) comparativement à ceux obtenus pour *TLL1* (entre 30 et 32) (Tableau XXXII) indiquent que *TLL6* serait donc 10 à 20 fois moins exprimée dans notre système biologique que *TLL1* et ne serait donc que très faiblement impliquée dans la régulation de la polyglutamylation de la tubuline chez les MDA-MB 231. La polyglutamylase initiateur *TLL1* (Wloga *et al.* 2008), bien qu'active uniquement sous forme de complexe (Janke *et al.* 2005), pourrait donc être impliquée dans l'augmentation de la polyglutamylation des microtubules chez les T8. *TLL12*, dont l'expression génique diminue dans les cellules résistantes T8, a été montrée être une polyglycylase (Janke and Kneussel 2010) et n'intervient donc pas dans la polyglutamylation de la tubuline.



**Figure 60 : Variation de la quantité des transcrits d'enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline dans les cellules Tv et T8**

Analyse par qRT-PCR du niveau d'ARNm des polyglutamylases *TTLL1-13*, de la tubuline tyrosine ligase *TTL* et des déglutamylases *CCP1/4/5*, avec représentation sous forme d'histogrammes des moyennes  $\pm$ écart-type des expressions relatives des transcrits présentant des variations significatives. Le tableau récapitule le ratio des expressions normalisées moyennes ( $Rn_{moy}$ ) des gènes entre les cellules sensibles Tv et résistantes T8.

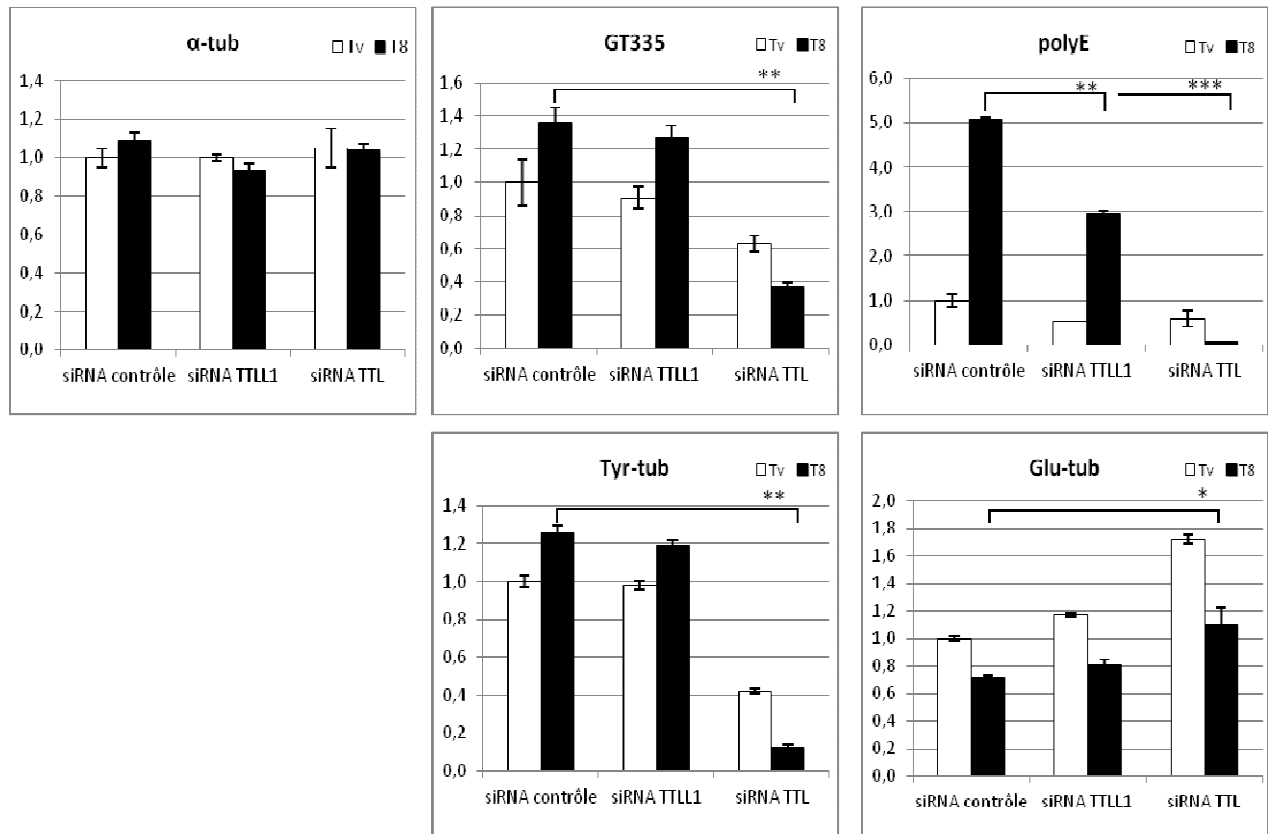
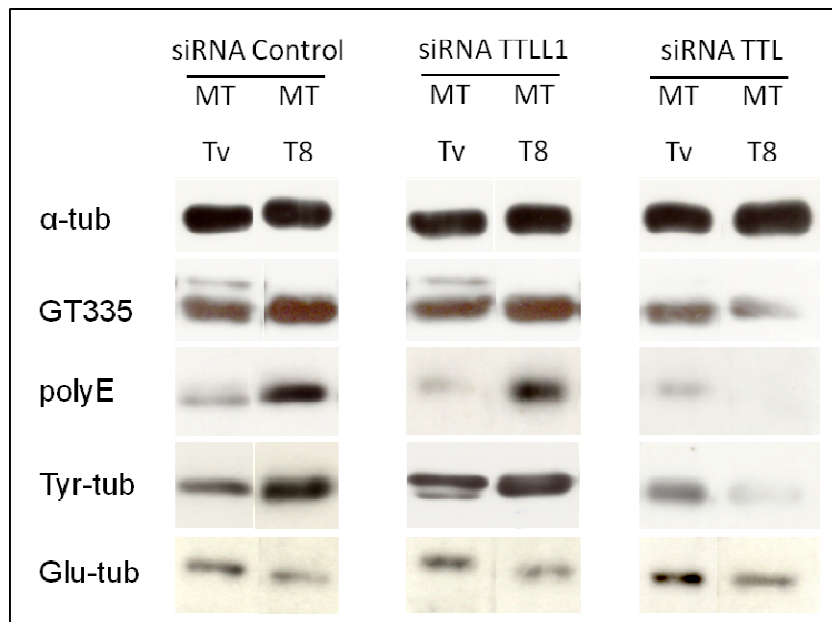
## **IV. IMPLICATION DE LA POLYGLUTAMYLATION ET DE LA TYROSINATION DE LA TUBULINE DANS LA RESTAURATION DE LA SENSIBILITE AU TAXOL DES CELLULES RESISTANTES T8**

Associées aux microtubules dans les cellules résistantes T8, l'inhibition partielle des septines par siRNA a précédemment permis de montrer leur implication dans la chimiorésistance au Taxol des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231. Les microtubules des cellules résistantes T8 étant davantage polyglutamylés et tyrosinés que ceux présents dans les cellules sensibles, nous avons alors cherché à savoir si l'inhibition des enzymes impliquées dans la mise en place de ces modifications post-traductionnelles pouvaient également restaurer la sensibilité des T8 au Taxol. Ces expériences ont été réalisées à la fois sur les cellules sensibles Tv et les cellules résistantes T8, mais les microtubules des T8 étant davantage polyglutamylés et tyrosinés, c'est sur ces cellules résistantes qu'un effet est attendu.

### **IV.1. Restauration de la sensibilité au Taxol des cellules résistantes T8 par inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase**

L'inhibition partielle par siRNA de la polyglutamylase initiatrice TTLL1 ne semble pas avoir d'effet, ou peu, sur la polyglutamylation ou la tyrosination (Figure 61), suggérant que le siRNA utilisé est non fonctionnel ou qu'une autre enzyme compense l'absence de TTLL1. En effet, d'après nos résultats de qPCR, TTLL1 n'est pas la seule polyglutamylase branchante exprimée dans les cellules (Figure 60). TTLL5 semble en effet fortement exprimée, avec des Ct obtenus pour ce gène cible d'environ 25 comparativement à ceux obtenus pour TTLL1, compris entre 30 et 32. Il est donc possible que d'autres polyglutamylases initiatrices telles que TTLL5, même si elle n'est pas différentiellement exprimée entre Tv et T8, compensent l'inhibition partielle d'expression de TTLL1.

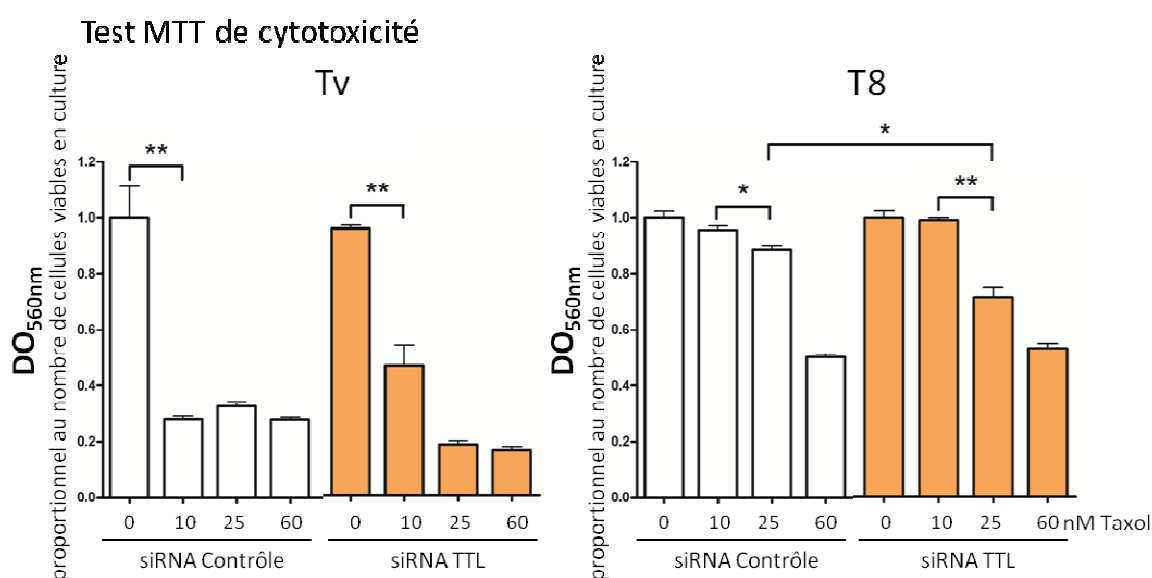
Par ailleurs, l'analyse par Western blot du niveau d'accumulation des modifications post-traductionnelles sur la tubuline après inhibition partielle de la tyrosine ligase TTL par siRNA montre non seulement une baisse attendue de la tyrosination au profit d'une augmentation de la glutamylation C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline, mais également une diminution associée de la longueur des chaînes polyglutamylées (polyE) et du nombre de branchements de chaînes latérales polyglutamylées (GT335) (Figure 61). Ces résultats suggèrent, de façon intéressante, une inter-relation entre tyrosination et polyglutamylation, avec une possible régulation de la longueur de la chaîne polyglutamylée par la tyrosination de la tubuline.



**Figure 61 : Inhibition partielle de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline par siRNA TTL mais pas par siRNA TLL1**

Analyse par Western blot de l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec un siRNA contrôle ou des siRNA ciblant la polyglutamylase banchante TLL1 ou la tyrosine ligase TTL. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

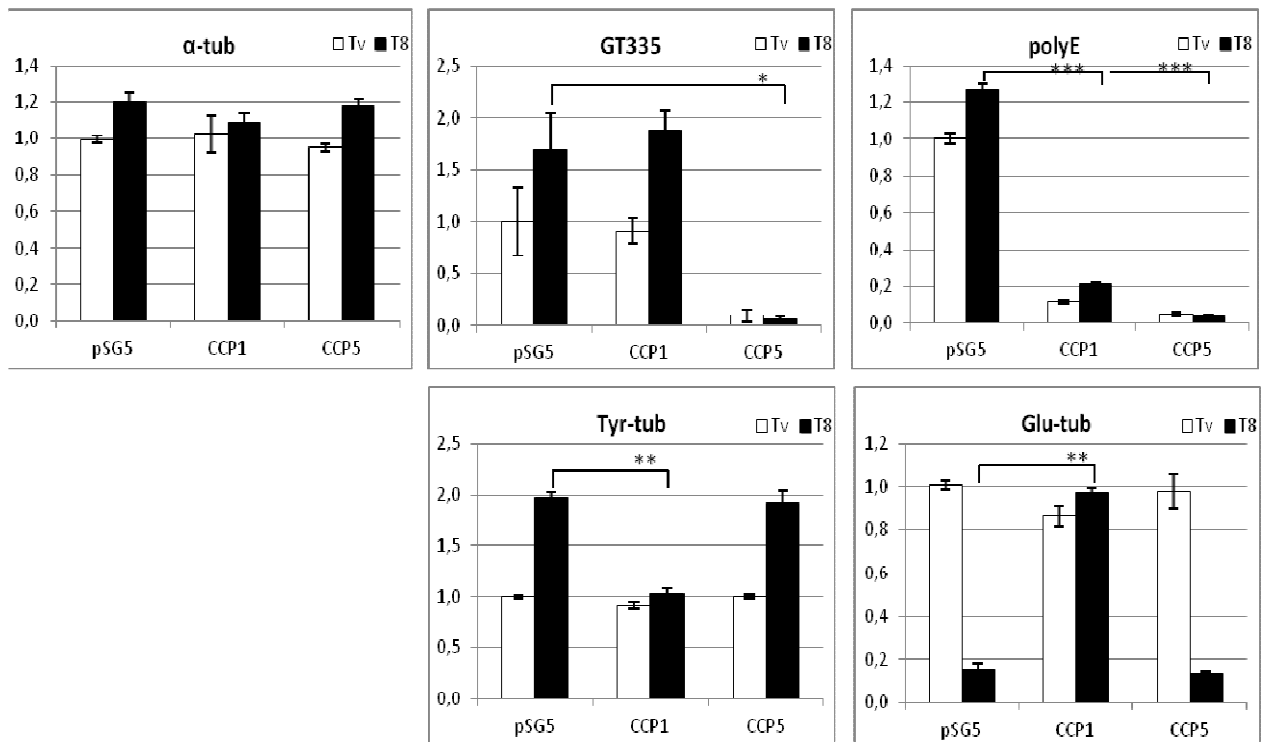
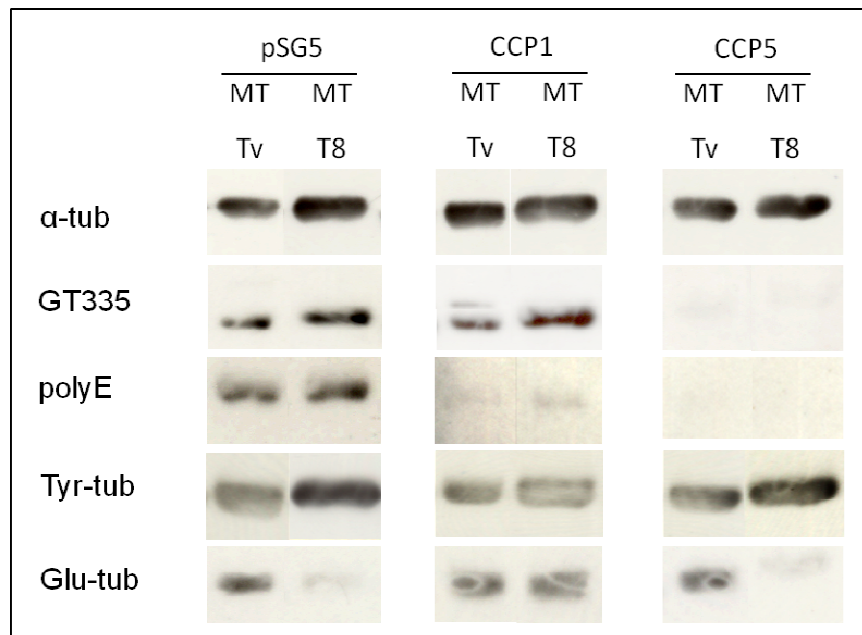
L'inhibition partielle de TTL ayant un impact non seulement sur la tyrosination mais également sur la polyglutamylation des microtubules, un test MTT de cytotoxicité du Taxol a été réalisé sur les cellules sensibles Tv et résistantes T8 afin d'estimer précisément les modulations de viabilité cellulaire quand on perturbe l'évènement de tyrosination (Figure 62). Après 24h de transfection avec le siRNA TTL, les cellules Tv et T8 ont été traitées avec les mêmes quatre concentrations de Taxol que pour le test MTT après inhibition partielle des septines, soit 0nM, 10nM, 25nM et 60nM. Après 48h de traitement au Taxol (soit après 72h de transfection siRNA), le test MTT de cytotoxicité montre une baisse de 28% de la viabilité cellulaire des cellules résistantes T8 entre 10 et 25nM de Taxol, alors qu'elle n'est que de 8% pour le siRNA contrôle (soit un écart de 22% entre les siRNA TTL et contrôle à 25nM). Les cellules sensibles Tv étant moins tyrosinées, l'inhibition partielle de la tyrosination n'a pas d'effet sur la sensibilité de ces cellules au Taxol.



**Figure 62 : Restauration de la sensibilité au Taxol de cellules résistantes par inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase par siRNA**

Les cellules Tv et T8 sont transfectées pour 72h avec le siRNA Contrôle et le siRNA TTL, et traitées le lendemain pour 48h avec quatre concentrations de Taxol correspondant aux conditions de culture des cellules Tv et T8 ou à leur IC<sub>50</sub>, avant d'effectuer un test MTT de cytotoxicité. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de trois mesures. \* et \*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  (test t de Student).

Bien que moins importante que la baisse de viabilité cellulaire observée avec l'inhibition partielle des septines dans les cellules résistantes, l'inhibition partielle de TTL par siRNA permet de restaurer partiellement la sensibilité au Taxol des cellules T8, impliquant la tyrosination et/ou la polyglutamylation dans la chimiorésistance au Taxol.



**Figure 63 : Influence d'une surexpression de déglutamylases sur l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline sur les microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8**

Analyse par Western blot de l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec des plasmides exprimant pSG5 (contrôle) ou les déglutamylases CCP1 et CCP5. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

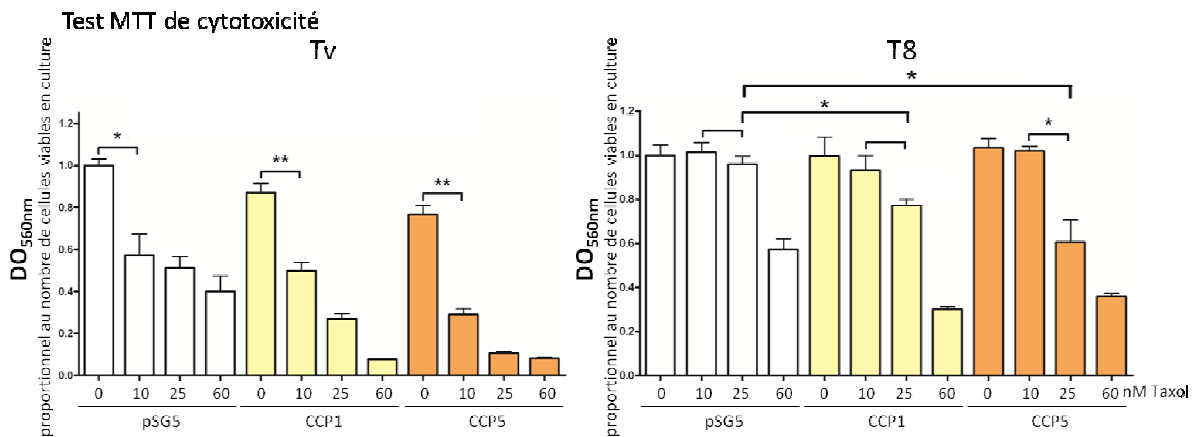
## **IV.2. Restauration de la sensibilité au Taxol des cellules T8 par la surexpression d'enzymes impliquées dans la déglutamylation de la tubuline**

Si en empêchant la polyglutamylation ou la tyrosination, on augmente la sensibilité des cellules résistantes au Taxol, on a alors cherché à savoir si la surexpression d'enzymes, comme les déglutamylases, empêchant l'accumulation excessive de ces modifications post-traductionnelles sur les microtubules, pouvaient également avoir un tel impact. Comme précédemment, ces expériences ont été réalisées à la fois sur les cellules sensibles Tv et les cellules résistantes T8, mais les microtubules des cellules T8 étant davantage polyglutamylés, c'est, là encore, sur les cellules résistantes qu'un effet est attendu.

La surexpression de CCP1, une déglutamylase permettant de raccourcir les chaînes latérales polyglutamylées, semble fonctionner dans nos cellules. En effet, l'analyse par Western blot de l'expression des modifications post-traductionnelles de tubuline montre une diminution de la longueur des chaînes polyglutamylées par le faible marquage polyE sans diminution du marquage de GT335 (Figure 63). De même, la surexpression de CCP5, une déglutamylase permettant de débrancher des chaînes latérales glutamylées, montre à la fois une diminution des longues chaînes (marquage polyE) et des résidus glutamates branchés (marquage GT335) (Figure 63). Il semble donc que dans notre modèle, CCP5 soit capable de débrancher des chaînes latérales sans avoir été au préalable raccourcies, contrairement à ce qui a été décrit (Rogowski *et al.* 2010). Par ailleurs, la surexpression de CCP1 montre une diminution de la tyrosination et une augmentation de la glutamylation de l' $\alpha$ -tubuline dans les cellules résistantes (Figure 63), confirmant l'activité controversée de tyrosine carboxypeptidase de CCP1 décrite récemment (Rogowski *et al.* 2010; Wloga and Gaertig 2010). En revanche, CCP5 ne possède pas cette activité tyrosine carboxypeptidase, puisque sa surexpression n'a pas d'effet sur le niveau de tyrosination/détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline (Figure 63).



De même, nous avons étudié l'implication de la déglutamylation de la tubuline dans la chimiorésistance au Taxol par un test MTT après surexpression des déglutamylases CCP1 et CCP5 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8 (Figure 64). Douze heures après la transfection avec les plasmides CCP1 et CCP5, les cellules Tv et T8 ont été traitées avec les mêmes quatre concentrations de Taxol que pour les tests MTT précédents, soit 0nM, 10nM, 25nM et 60nM. Après 36h de traitement au Taxol (soit après 48h de transfection des plasmides), un test MTT de cytotoxicité est réalisé. Alors que les cellules T8, non transfectées ou transfectées par un plasmide vide (pSG5), résistent et ne montrent aucune mortalité cellulaire à 25nM de Taxol, une baisse de 41% de la viabilité cellulaire des cellules T8 surexprimant CCP5 est observée entre 10 et 25nM de Taxol, contre 17% de baisse pour celles surexprimant CCP1 (soit un écart de 36% et de 18% respectivement par rapport au siRNA Contrôle à 25nM). Même chez les cellules Tv, la sensibilité au Taxol est augmentée après transfection de ces déglutamylases, surtout avec CCP5.

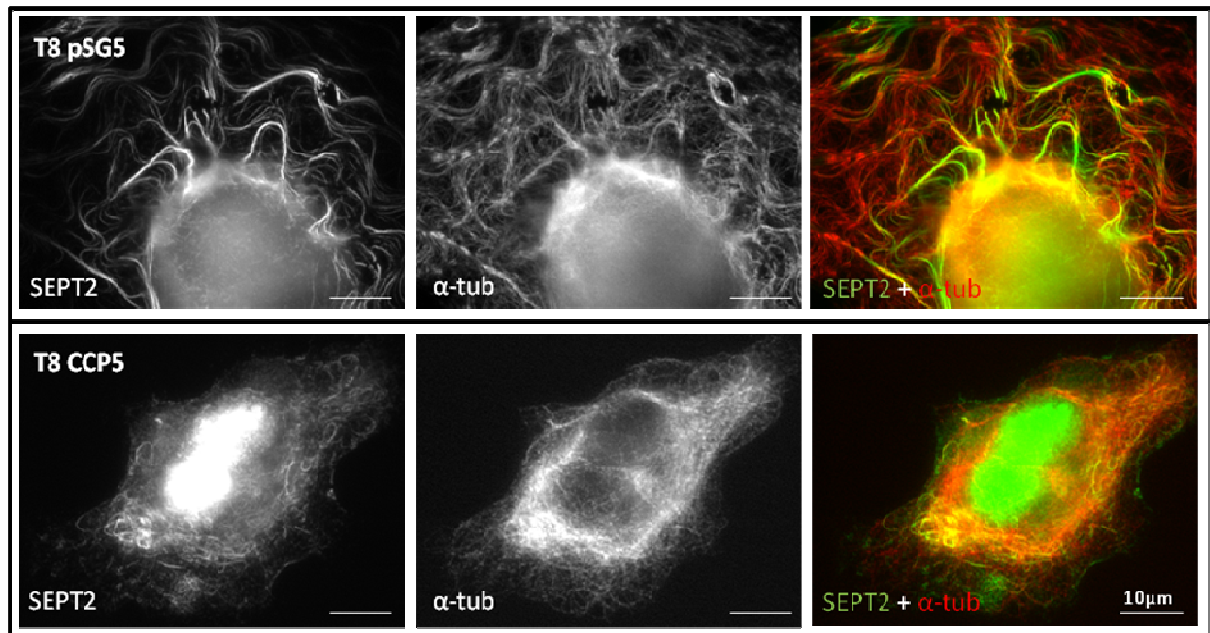


**Figure 64 : Restauration de la sensibilité au Taxol de cellules résistantes par surexpression de la déglutamylase CCP5**

Les cellules Tv et T8 sont transfectées pour 48h avec les plasmides pSG5 (contrôle), CCP1 et CCP5 à 1µg/mL, et traitées pour 36h avec quatre concentrations de Taxol correspondant aux conditions de culture des cellules Tv et T8 ou à leur IC<sub>50</sub>, avant d'effectuer un test MTT de cytotoxicité. Chaque valeur correspond à la moyenne ± écart-type de trois mesures. \* et \*\* correspondent respectivement à p<0,05 et p<0,01 (test t de Student).

Ces résultats montrent une restauration partielle de la sensibilité au Taxol des cellules T8 par la surexpression des déglutamylases CCP1 et CCP5, raccourcissant et débranchant respectivement les chaînes latérales polyglutamylées. Ces expériences suggèrent, comme les expériences d'inhibition de la TTL (affectant aussi la polyglutamylation) que la polyglutamylation est également impliquée dans la chimiorésistance au Taxol des cellules MDA-MB 231.

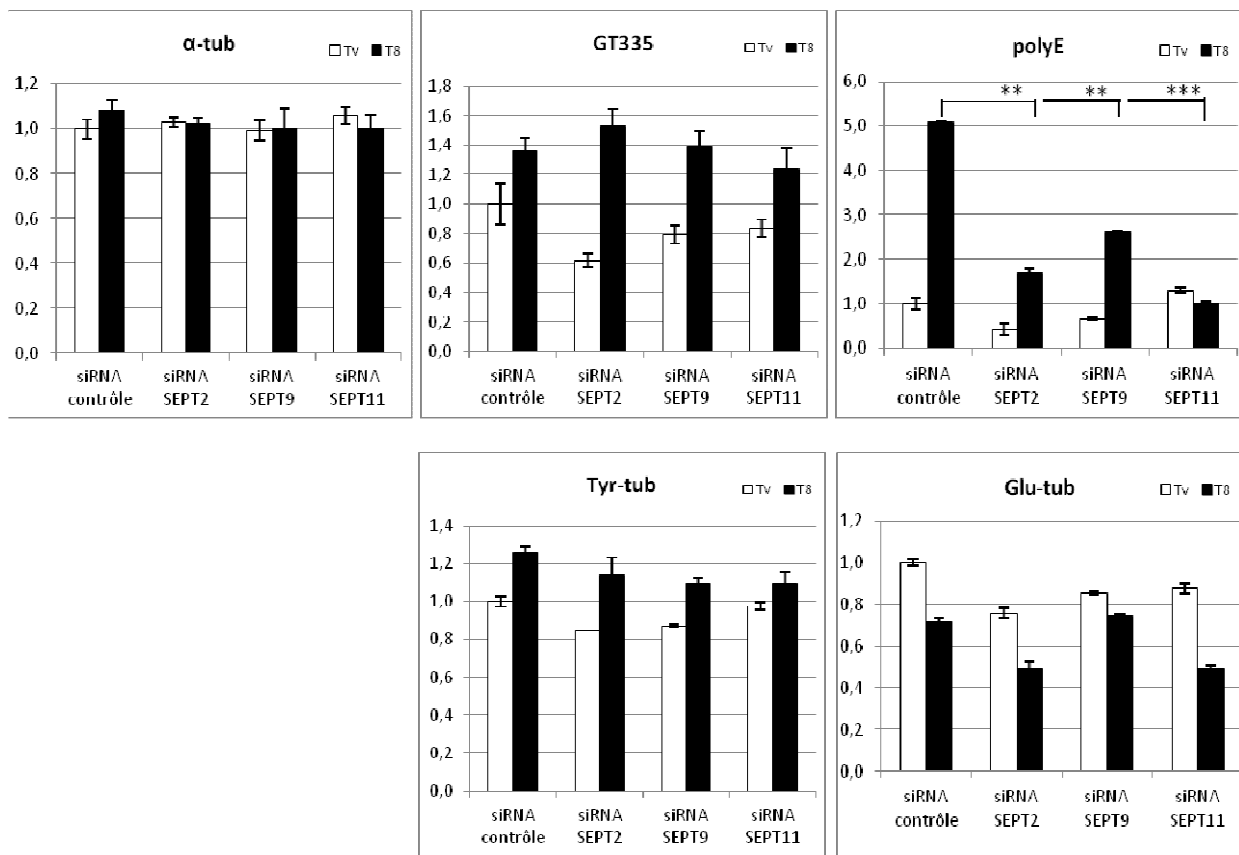
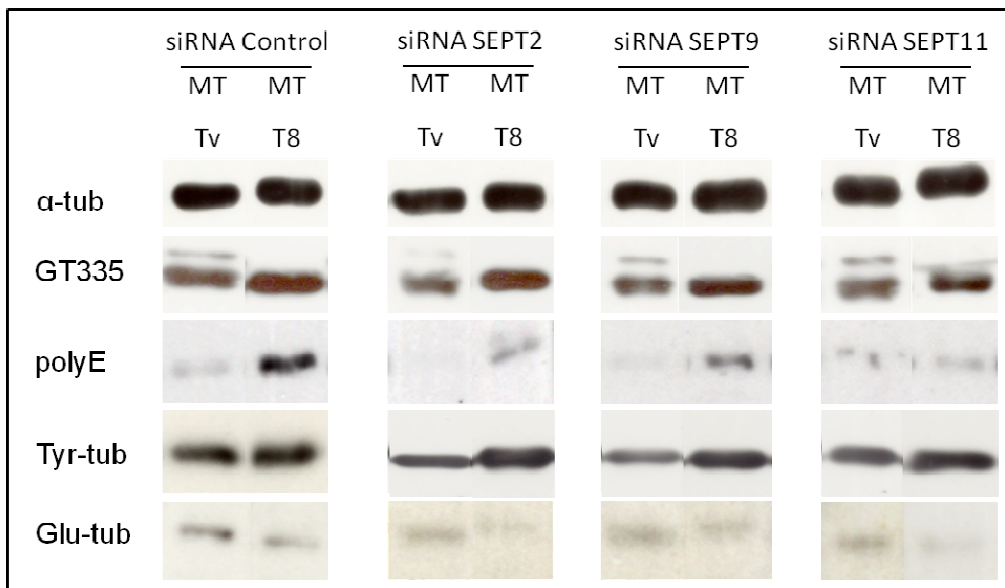
Parallèlement, un double marquage en immunofluorescence de SEPT2 et de l' $\alpha$ -tubuline après surexpression de la déglutamylase CCP5 dans les cellules résistantes T8 montre une désorganisation partielle des septines (Figure 65). Après clivage des chaînes latérales polyglutamylées par CCP5, les septines semblent être plus diffuses dans le cytoplasme et donc moins recrutées sur les microtubules des cellules T8, par comparaison au contrôle de transfection pSG5.



**Figure 65 : Désorganisation partielle de SEPT2 par surexpression de la déglutamylase CCP5 dans les cellules résistantes T8**

Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (en vert) et d' $\alpha$ -tubuline (en rouge) dans les cellules T8 après transfection transitoire du plasmide pSG5 (contrôle) et CCP5.

L'absence de chaînes latérales polyglutamylées pourrait donc empêcher le recrutement des septines sur les microtubules des cellules T8, d'où la restauration de la sensibilité au Taxol de ces cellules. La tyrosination, semblant également réguler la longueur de la chaîne polyglutamylée (voir Figure 61), pourrait aussi contribuer au phénotype chimiorésistant de cette manière.



**Figure 66 : Influence d'une inhibition partielle des septines par siRNA sur l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline**

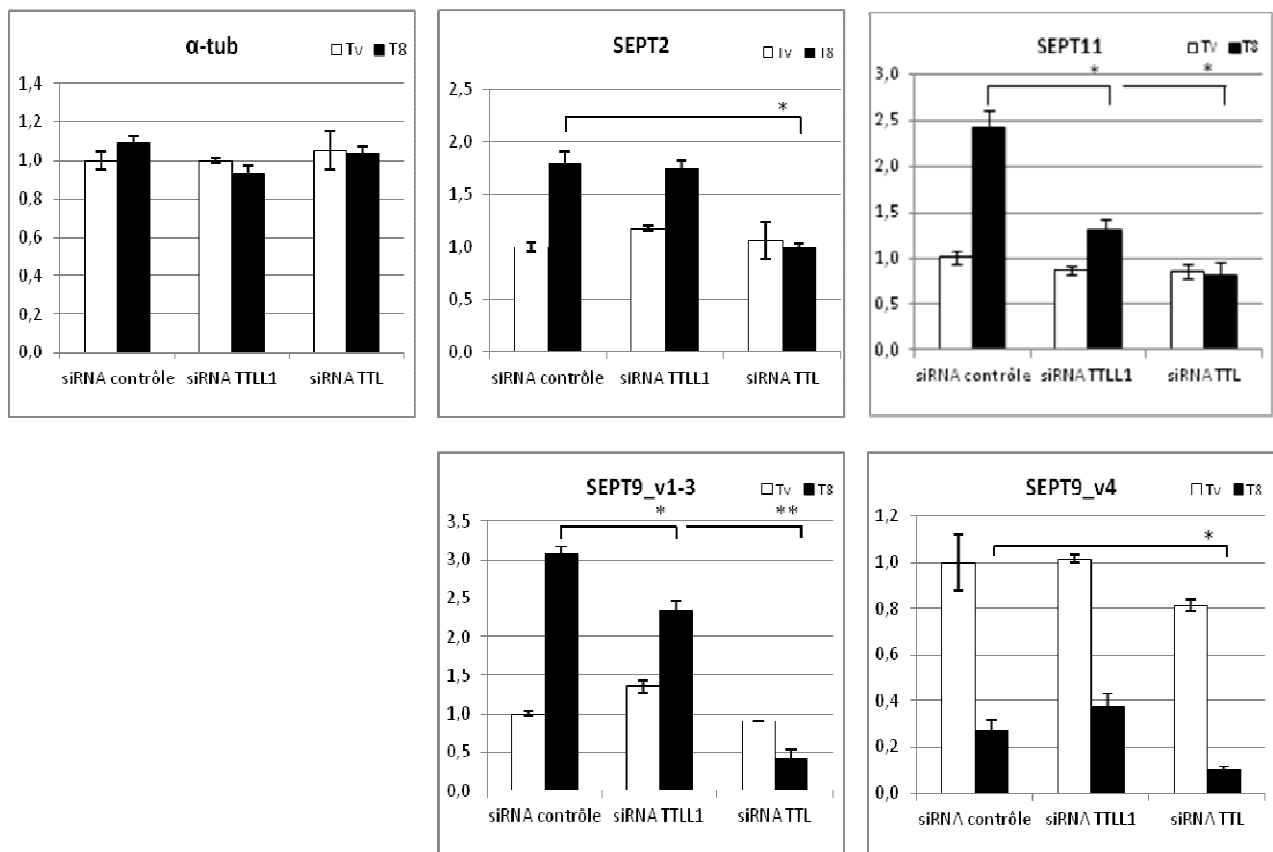
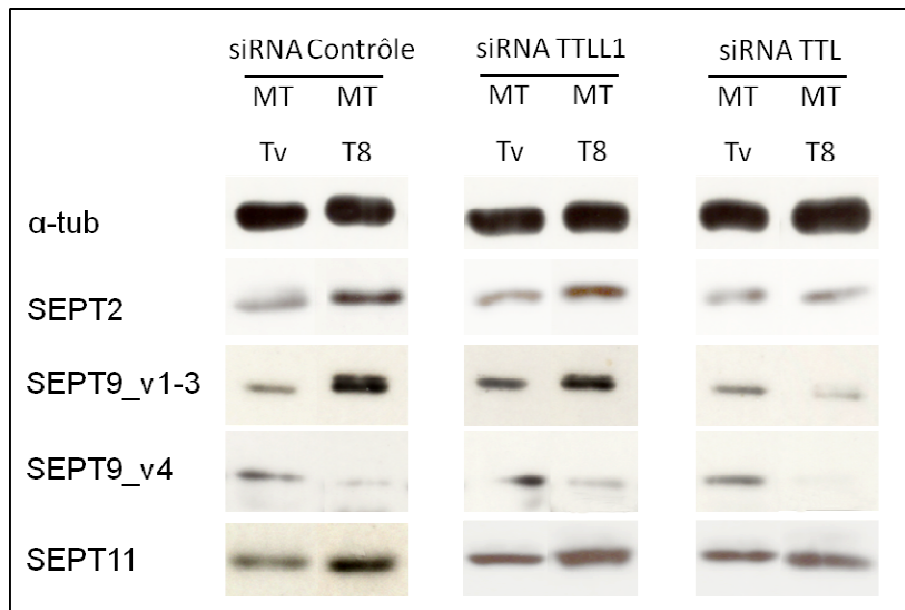
Analyse par Western blot de l'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec un siRNA contrôle ou des siRNA ciblant différentes Septines. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

## **V. INTER-RELATIONS SEPTINES-POLYGLUTAMYLATION DE TUBULINE DANS LA RESTAURATION DE LA SENSIBILITE AU TAXOL DES CELLULES RESISTANTES**

Au cours de nos expériences d'interférence ARN, dont certaines ont permis de restaurer partiellement une sensibilité au Taxol des cellules résistantes T8, nous nous sommes également intéressés à l'impact de l'inhibition des septines sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline, et inversement, à l'impact de l'inhibition des enzymes impliquées dans la polyglutamylation ou la tyrosination/détyrosination de la tubuline sur le recrutement des septines sur les microtubules.

### **V.1. Influence de l'inhibition partielle des septines sur la polyglutamylation mais pas sur la tyrosination de la tubuline**

Si l'on s'intéresse au niveau d'accumulation de certaines modifications post-traductionnelles sur la tubuline polymérisée, des expériences préliminaires indiquent que l'inhibition partielle des septines par siRNA ne semble avoir d'impact, ni sur le nombre de branchement de chaînes latérales polyglutamylées (visualisé avec GT335), ni sur le cycle de tyrosination/détyrosination (voir Tyr-tub et Glu-tub) (Figure 66). En revanche, leur inhibition, en particulier celles de SEPT2 et de SEPT11, et dans une moindre mesure celle de SEPT9, diminue la longueur des chaînes polyglutamylées (visualisée avec polyE) dans les fractions microtubulaires des cellules résistantes T8 (Figure 66).



**Figure 67 : Influence de l'inhibition partielle de certaines enzymes responsables des niveaux de polyglutamylation et tyrosination de la tubuline sur l'expression des septines**

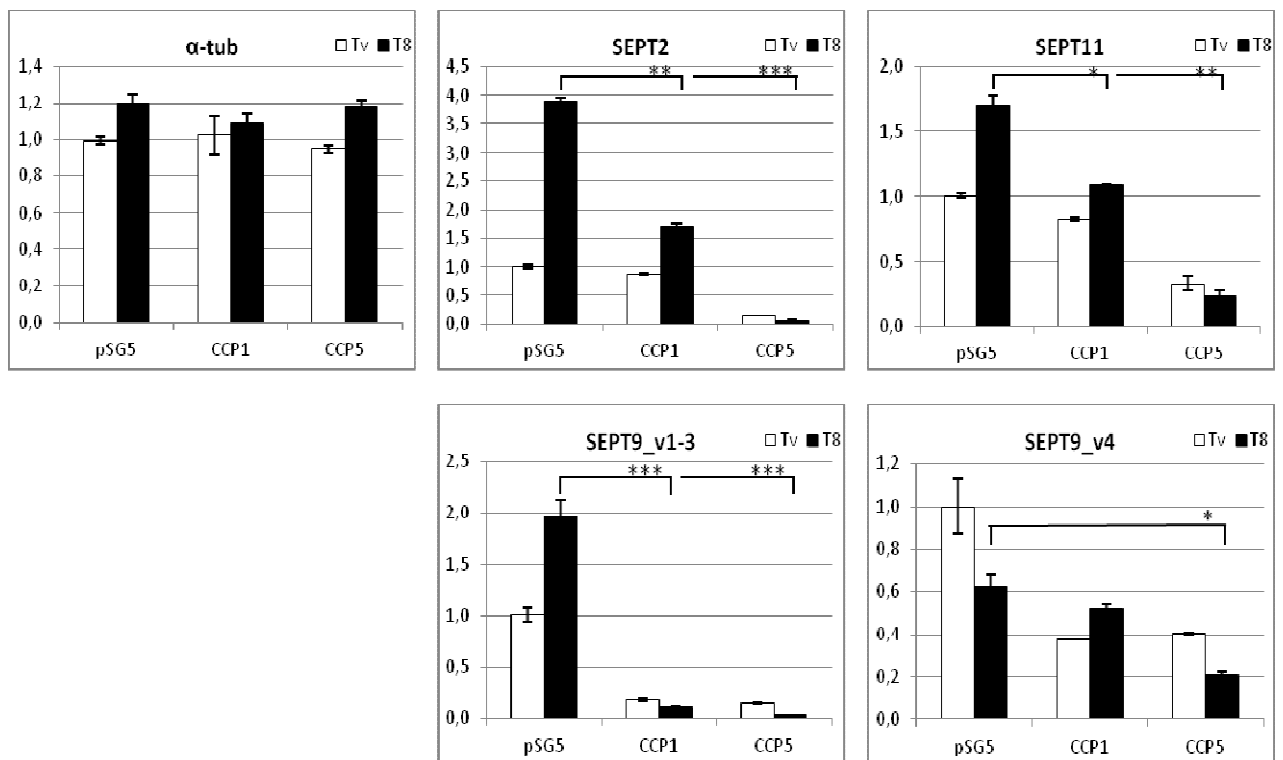
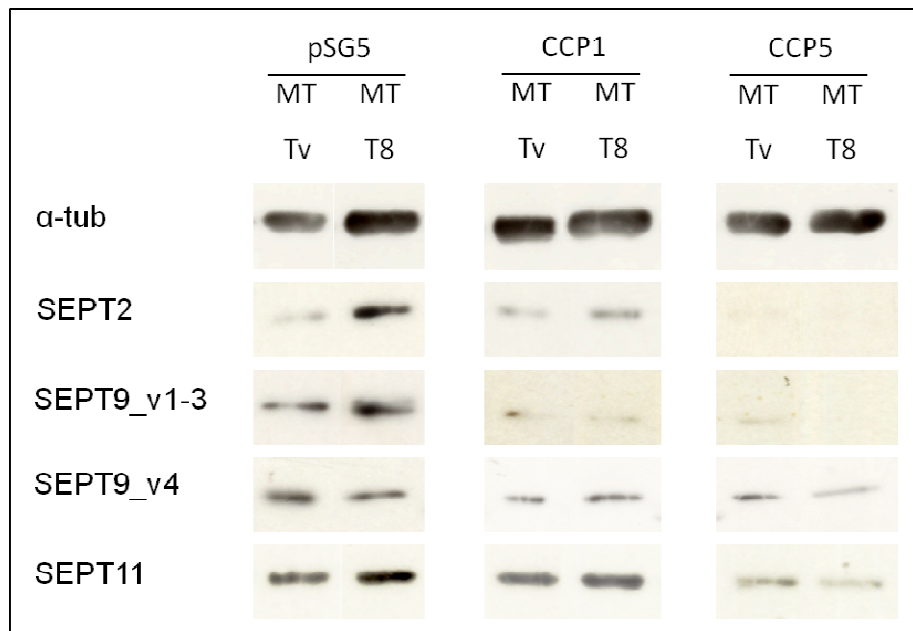
Analyse par Western blot de l'accumulation des septines dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec des siRNA contrôle, TTLL1 et TTL. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \* et \*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ .

Non seulement en accord avec le fait, déjà décrit dans la littérature, que les septines sont nécessaires au maintien de microtubules polyglutamylés pour faciliter un transport vésiculaire efficace (Spiliotis *et al.* 2008), nos résultats semblent, de plus, suggérer leur implication dans la régulation de la longueur des chaînes polyglutamylées.

## **V.2. Influence de l'inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase sur le recrutement des septines sur les microtubules**

L'inhibition partielle de la polyglutamylase initiatrice TLL1 n'a pas d'effet sur le niveau d'accumulation de tubuline polyglutamylée (Figure 61) et ne semble pas non plus, ou peu, modifier le recrutement des septines sur les microtubules (Figure 67). Mais, comme discuté précédemment, la question relative à la fonctionnalité de ce siRNA ou à la possible compensation de cette inhibition par une autre polyglutamylase initiatrice reste entière et ne nous permet pas de conclure.

Par contre, l'inhibition partielle de la tubuline tyrosine ligase TTL semble perturber le recrutement des septines puisque la quantification des Western-blot montre une diminution de l'accumulation de SEPT2, SEPT9\_v1-3 et, dans une moindre mesure, celles de SEPT9\_v4 et SEPT11 dans la fraction microtubulaire des cellules T8 (Figure 67).



**Figure 68 : Influence d'une surexpression de déglutamylases sur l'expression des septines**

Analyse par Western blot de l'expression des septines dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec les plasmides pSG5 (contrôle), CCP1 et CCP5. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 ou 3 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*, \*\* et \*\*\* correspondent respectivement à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

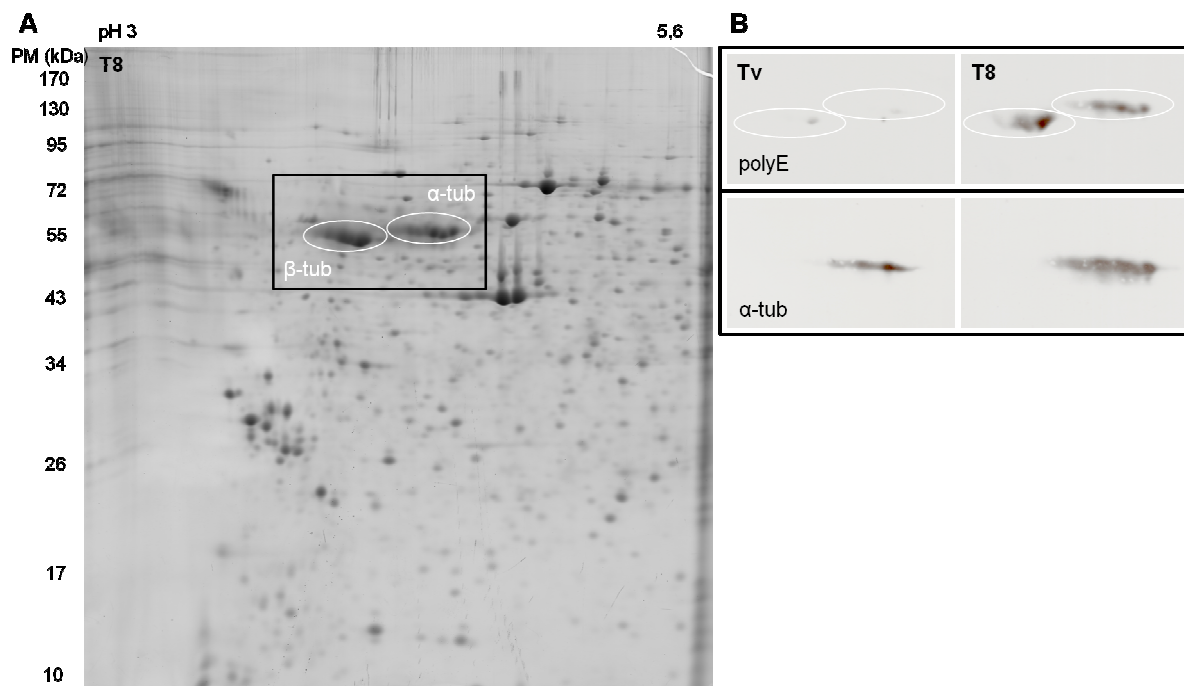
La tyrosination pourrait donc également être impliquée dans le recrutement des septines sur les microtubules des cellules T8. Quant à l'influence de la polyglutamylation sur la localisation microtubulaire de ces protéines, il est impossible de conclure puisque d'autres TTLs sont susceptibles de compenser l'inhibition de TTL1 comme suggéré précédemment.

### **V.3. Influence de la surexpression des déglutamylases sur le recrutement des septines**

Même si l'inhibition de TTL1 ne démontre pas une régulation du recrutement des septines par la polyglutamylation, la surexpression de la déglutamylase CCP1, qui raccourcit les chaînes latérales polyglutamylées, met clairement en évidence une diminution du recrutement de SEPT2, SEPT9\_v1-3, SEPT11 et plus légèrement de SEPT9\_v4 dans les microtubules des cellules T8 (Figure 68).

Cette diminution de recrutement des septines est encore plus fortement accentuée après surexpression de la déglutamylase débranchante CCP5, où les septines ne sont pratiquement plus détectables dans la fraction microtubulaire des cellules T8 (Figure 68).





**Figure 69 : Degré de polyglutamylation des microtubules des cellules sensibles et résistantes**

**A** : Coloration au SYPRO-Ruby d'un gel 2-DE à pH3-5,6 non linéaire d'extraits microtubulaires de cellules T8, **B** : Analyse par Western blot de la zone encadrée de (A), restreinte aux tubulines  $\alpha$ - et  $\beta$ -, après 2-DE à pH3-5,6 non linéaire d'extraits microtubulaires de cellules Tv et T8, de l'expression de tubuline polyglutamylée (polyE). 250 $\mu$ g d'extraits microtubulaires ont été déposés. L' $\alpha$ -tubuline est utilisé comme contrôle de charge protéique.

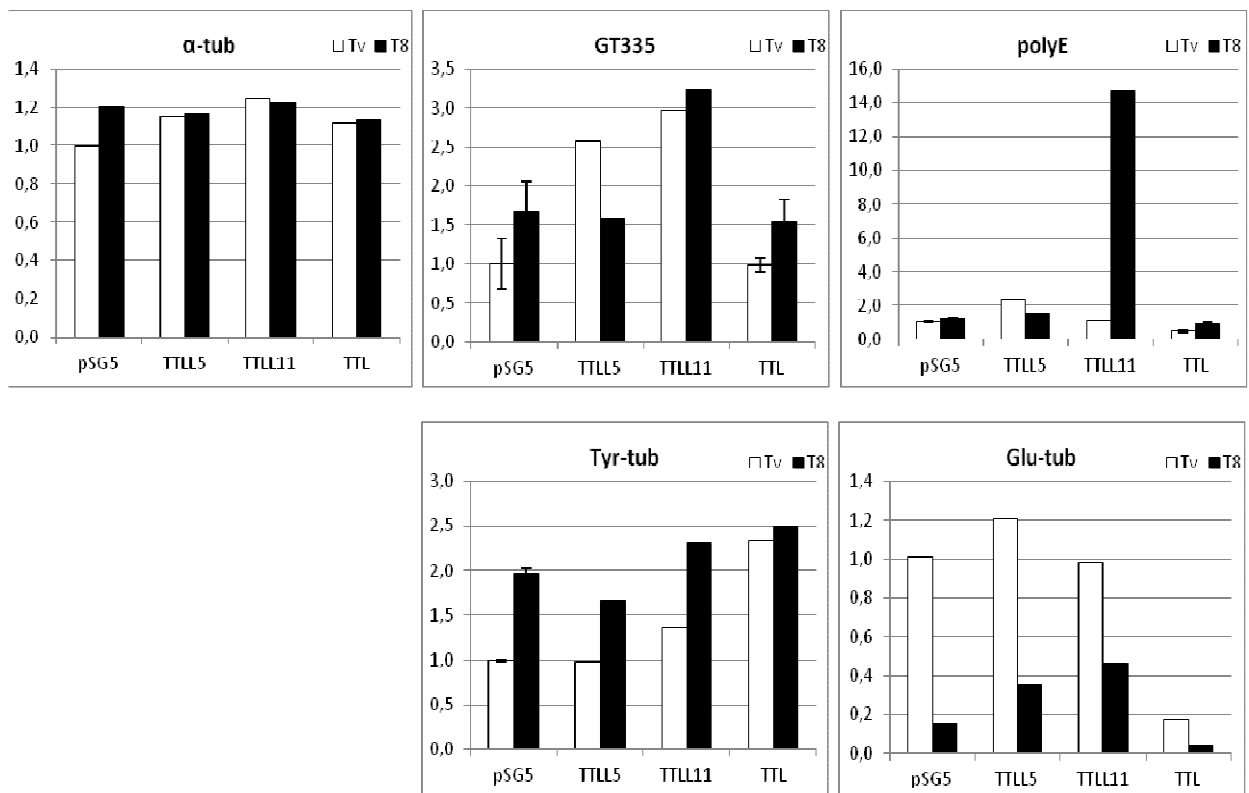
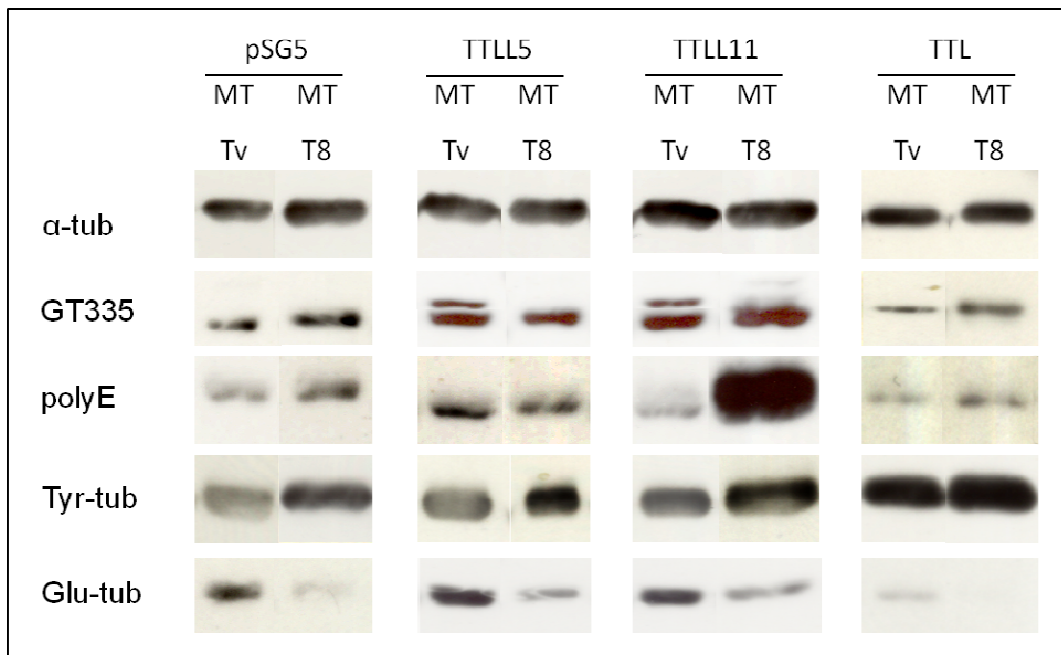
Un raccourcissement des chaînes polyglutamylées pourrait donc empêcher ou perturber le recrutement des septines, suggérant l'importance de la longueur de ces chaînes de polyglutamate dans le recrutement des septines sur les microtubules des cellules T8.

#### V.4. Influence de la longueur de la chaîne polyglutamylée

Afin d'évaluer le degré de polyglutamylation des microtubules des cellules sensibles et résistantes au Taxol, un Western blot a été réalisé suite à une 2-DE sur une gamme de pH très restreinte (pH3-5,6 Non Linéaire) pour séparer au maximum les différents spots d' $\alpha$  de  $\beta$ -tubuline (Figure 69 A). La coloration du gel au Bleu de Coomassie montre plusieurs spots correspondant à l' $\alpha$ -tubuline et plusieurs spots (côté plus acide) correspondant à la  $\beta$ -tubuline (Figure 69 A).

Même si dans ces expériences, réalisées à quantités de protéines égales, les fractions microtubulaires des cellules T8 renferment proportionnellement plus de tubuline que celles des cellules Tv (dû à l'effet du Taxol sur la tubuline), l'immunomarquage révèle au minimum quatre spots d' $\alpha$ -tubuline et trois spots de  $\beta$ -tubuline polyglutamylés dans les cellules résistantes T8 (Figure 69 B). En revanche, seul un spot d' $\alpha$  et de  $\beta$ -tubuline est révélé avec l'anticorps anti-polyE dans les cellules sensibles Tv. Les résidus glutamate ajoutés en chaîne latérale acidifiant l' $\alpha$ - ou la  $\beta$ -tubuline, les trains de spots observés, décalés vers le côté plus acide du gel, pourraient correspondre à des isotopes de plus en plus polyglutamylés.

Ces résultats sont en accord avec ceux des Western blot 1D, où la tubuline apparaît davantage polyglutamylée dans les cellules T8 que dans les Tv. Si le nombre de spots polyglutamylés observé peut être corrélé au nombre de résidus glutamate ajoutés en chaîne latérale (Edde *et al.* 1992; Audebert *et al.* 1993), on pourrait considérer que la tubuline des cellules Tv, peu polyglutamylée, aurait au maximum 3 résidus glutamate en chaîne latérale, puisque l'anticorps anti-polyE reconnaît à partir de 3 résidus glutamate. Par contre, les chaînes latérales polyglutamylées de la tubuline des cellules T8 varieraient de trois à six résidus glutamate, puisque quatre spots d' $\alpha$ -tubuline polyglutamylée correspondraient à six résidus. Sachant cependant que de nouveaux isotopes de  $\beta$ -tubuline (comme  $\beta$ IV et  $\beta$ III dont le pI est légèrement différent de celui de  $\beta$ I) entrent dans la composition des microtubules des cellules résistantes T8, il faut donc rester prudent quant à l'estimation, à partir d'un nombre de spots 2D, du nombre de résidus glutamate de la chaîne latérale polyglutamylée de  $\beta$ -tubuline.



**Figure 70 : Influence d'une surexpression d'enzymes responsables de modifications post-traductionnelles de tubuline sur l'expression des modifications post-traductionnelles de tubuline**

Analyse par Western blot de l'expression des modifications post-traductionnelles de tubuline dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec les plasmides pSG5 (contrôle), TTLL5, TTLL11 et TTL. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne ± s.e.m. de 1 à 3 expériences.

## **VI. TENTATIVE D'INSTAURATION D'UNE RESISTANCE AU TAXOL DES CELLULES SENSIBLES PAR SUREXPRESSON DES POLYGLUTAMYLASES ET DE LA TYROSINE LIGASE**

### **VI.1. Influence de la surexpression de polyglutamylases et de la tyrosine ligase sur le niveau d'expression des modifications post-traductionnelles de tubuline**

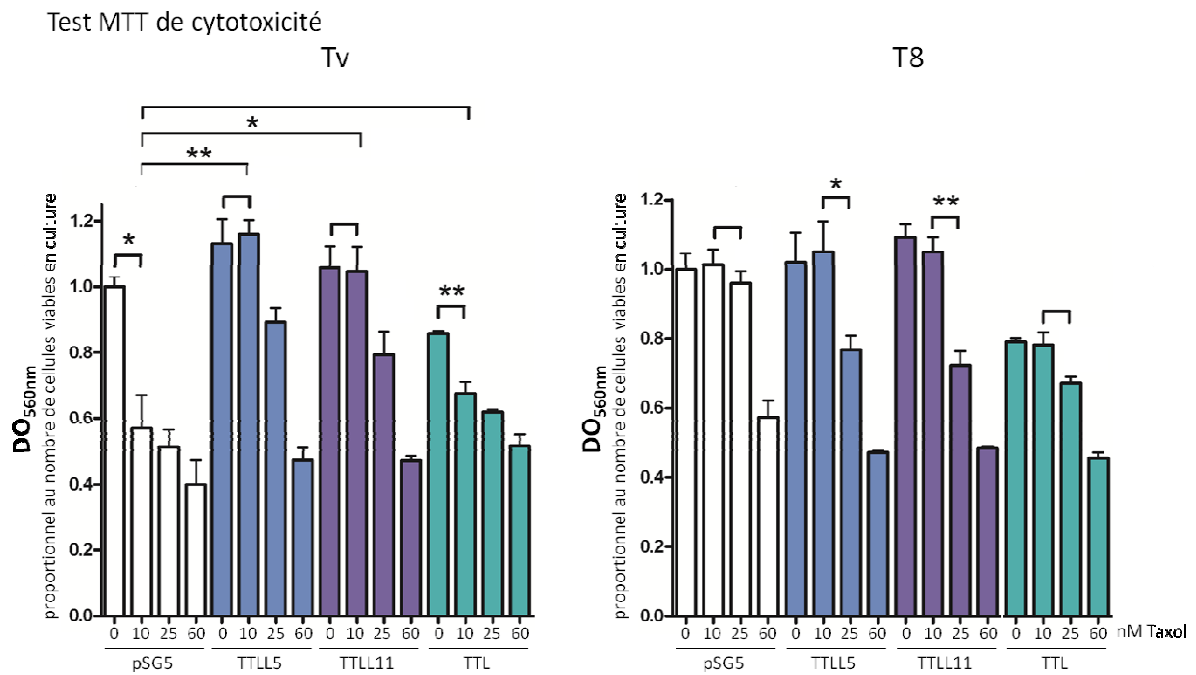
Dans les expériences précédentes, nous avons réussi à restaurer une certaine sensibilité au Taxol des cellules résistantes T8 de trois manières différentes, en inhibant partiellement l'expression des septines, en inhibant partiellement la tyrosination de la tubuline, mais aussi en surexprimant les déglutamylases CCP1 et CCP5.

Inversement, des expériences pour tenter d'instaurer une résistance au Taxol des cellules sensibles Tv ont été menées en surexprimant la polyglutamylase initiatrice TTLL5, la polyglutamylase élongatrice TTLL11 et la tyrosine ligase TTL. Ces expériences ont été réalisées à la fois sur les cellules sensibles Tv et les cellules résistantes T8, mais les microtubules des cellules Tv étant faiblement polyglutamylés et tyrosinés, c'est sur ces cellules qu'un effet est attendu.

L'analyse par Western blot des modifications post-traductionnelles de tubuline après surexpression de la polyglutamylase initiatrice TTLL5 montre une augmentation de la polyglutamylation, aussi bien des branchements (GT335) que de l'élongation des chaînes latérales (polyE), dans les cellules sensibles Tv par rapport au contrôle pSG5 (Figure 70). La surexpression de TTLL5 n'a en revanche pas d'influence sur la tyrosination (Tyr-tub)/détyrosination (Glu-tub) de la tubuline.

La surexpression de la polyglutamylase élongatrice TTLL11 dans les cellules résistantes T8 montre une augmentation des branchements de chaînes latérales, et surtout une très forte augmentation des longues chaînes polyglutamylées indiquant que la surexpression de cette enzyme est fonctionnelle et peut allonger de courtes chaînes latérales de glutamate préexistantes (Figure 70). Dans les cellules sensibles Tv, la tubuline, présentant peu de branchements glutamate, ne peut devenir hautement polyglutamylée même en surexprimant TTLL11. Que ce soit dans les cellules Tv ou T8, aucune modification de la tyrosination ou de la glutamylation C-terminale de la tubuline n'est observée (Figure 70).

Par ailleurs, la surexpression de la tyrosine ligase TTL entraîne une augmentation significative de la tyrosination des microtubules des cellules Tv, associée à une diminution de la glutamylation (détyrosination). Cette accumulation de tubuline tyrosinée dans ces cellules ne semble pas avoir d'influence sur le degré de polyglutamylation (GT335 et polyE) des microtubules (GT335 et polyE) (Figure 70). La tubuline des cellules résistantes T8 étant déjà très fortement tyrosinée, la surexpression de TTL n'a quasiment pas d'effet sur ces modifications post-traductionnelles.



**Figure 71 : Instauration d'une résistance au Taxol de cellules sensibles par surexpression de la polyglutamylase TTLL5**

Les cellules Tv et T8 sont transfectées pour 48h avec les plasmides pSG5 (contrôle), TTLL5, TTLL11 et TTL à 1µg/mL, et traitées pour 36h avec quatre concentrations de Taxol correspondant aux conditions de culture des cellules Tv et T8 ou à leur IC<sub>50</sub>, avant d'effectuer un test MTT de cytotoxicité. Chaque valeur correspond à la moyenne ± écart-type de trois mesures. \* et \*\* correspondent respectivement à p<0,05 et p<0,01 (test t de Student).

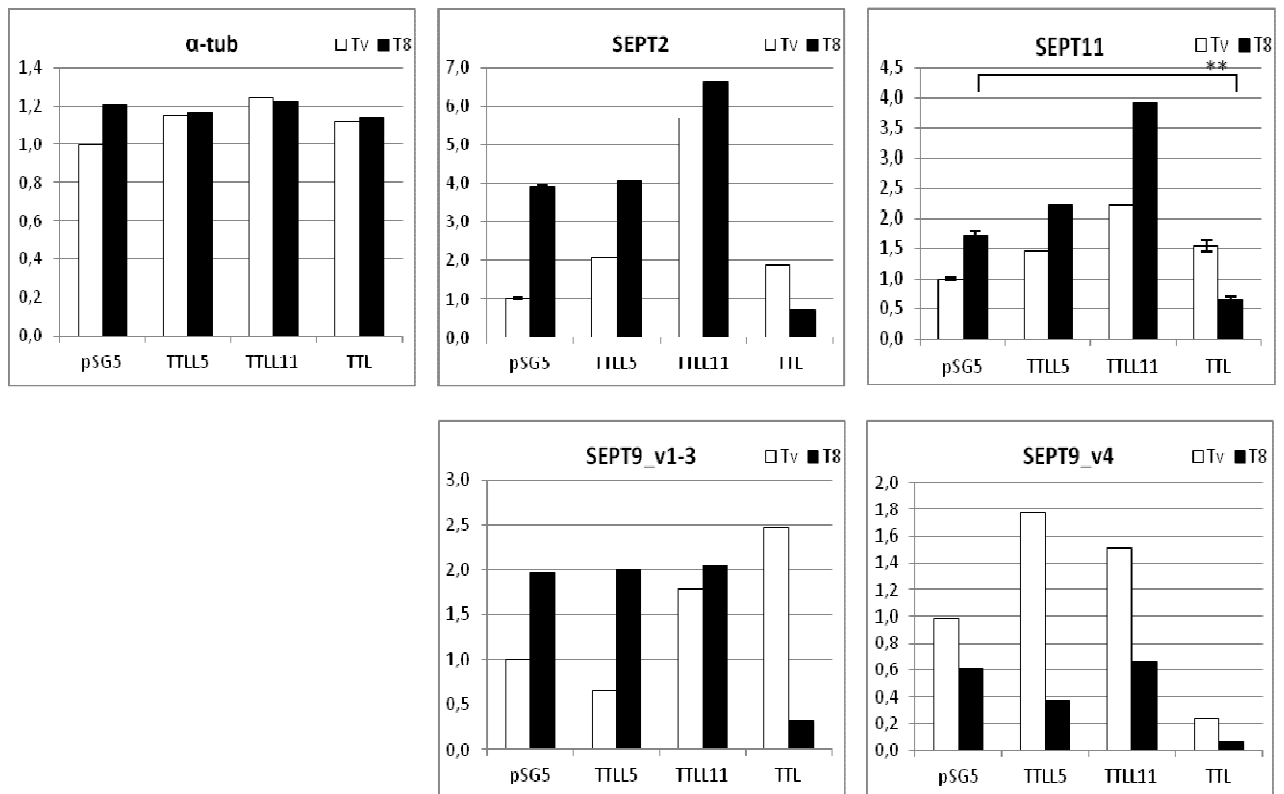
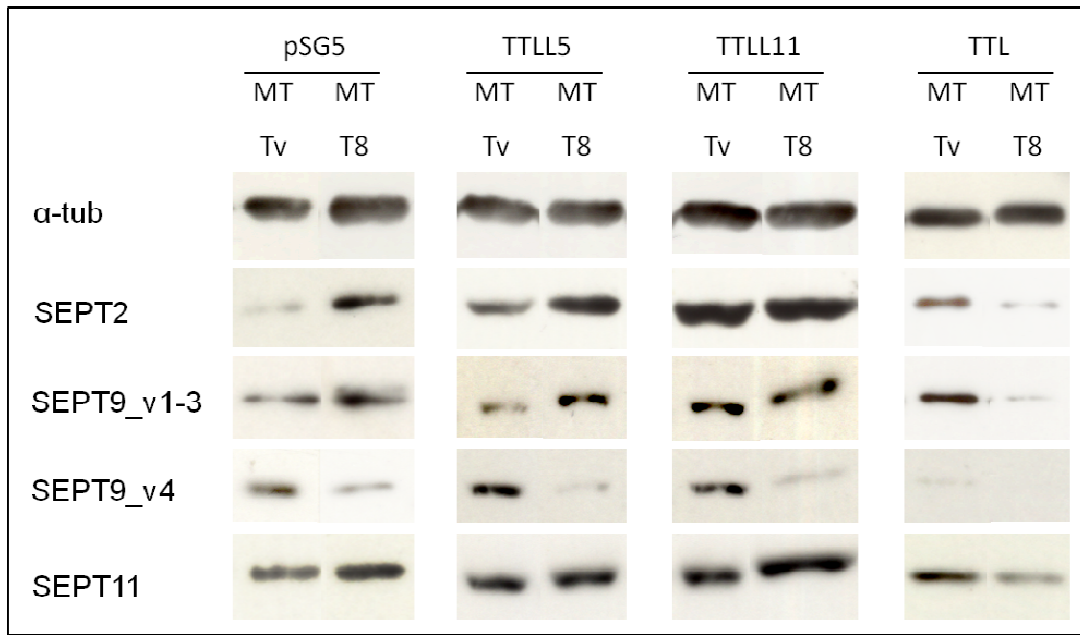
## **VI.2. Influence d'une surexpression de polyglutamylases et de la tyrosine ligase sur la sensibilité au Taxol des cellules sensibles et résistantes**

Après avoir vérifié l'efficacité de la surexpression des polyglutamylases TTLL5 et TTLL11 et de la tyrosine ligase TTL sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline, nous nous sommes intéressés à leur impact sur la sensibilité au Taxol des cellules sensibles Tv et résistantes T8.

Un test MTT de cytotoxicité, réalisé 48h après transfection des cellules avec les plasmides exprimant les 3 enzymes d'intérêt TTLL5, TTLL11 et TTL, révèle que la surexpression de TTLL5 et de TTLL11 dont on a précédemment montré l'impact sur la polyglutamylation de la tubuline, abolit la sensibilité des cellules sensibles Tv à 10nM de Taxol. A cette concentration, une mortalité de l'ordre de 30 à 50% est généralement observée chez les cellules sensibles (voir le contrôle pSG5) (Figure 71). Par contre, la surexpression de la tubuline tyrosine ligase TTL, n'induisant pas de polyglutamylation de tubuline, ne permet pas, comme attendu, d'instaurer une telle résistance des cellules Tv au Taxol.

Par ailleurs, il apparaît que la surexpression de TTLL5 et de TTLL11, augmentant à la fois le nombre de chaînes latérales et la longueur des chaînes latérales polyglutamylées chez les cellules T8, augmente leur sensibilité à 25nM de Taxol d'environ 30% (Figure 71), concentration à laquelle les cellules résistantes T8 sont cultivées et donc à laquelle elles résistent (voir contrôle pSG5).

Ces expériences montrent qu'il est également possible d'instaurer une résistance au Taxol des cellules sensibles Tv en surexprimant une TTLL permettant de générer ou d'allonger des chaînes latérales polyglutamylées. Mais la surexpression de la tyrosine ligase n'a pas permis d'instaurer une résistance partielle des cellules Tv à 10nM de Taxol. La surexpression de polyglutamylases initiatrice et élongatrice dans les cellules résistantes, dont les microtubules sont déjà fortement polyglutamylés, restaurent partiellement la sensibilité des cellules T8, suggérant, comme dans les neurones (Rogowski *et al.* 2010), un effet délétère d'une polyglutamylation excessive.



**Figure 72: Influence de la surexpression de polyglutamylases et de tubuline tyrosine ligase sur l'accumulation des septines dans les fractions microtubulaires des cellules Tv et T8**

Analyse par Western blot de l'accumulation des septines dans les fractions microtubulaires (MT) après transfection des cellules Tv et T8 avec les plasmides pSG5 (contrôle), TTLL5, TTLL11 et TTL. Les fractions microtubulaires ont été déposées à quantités de tubuline égales entre Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme contrôle de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 1 à 3 expériences.

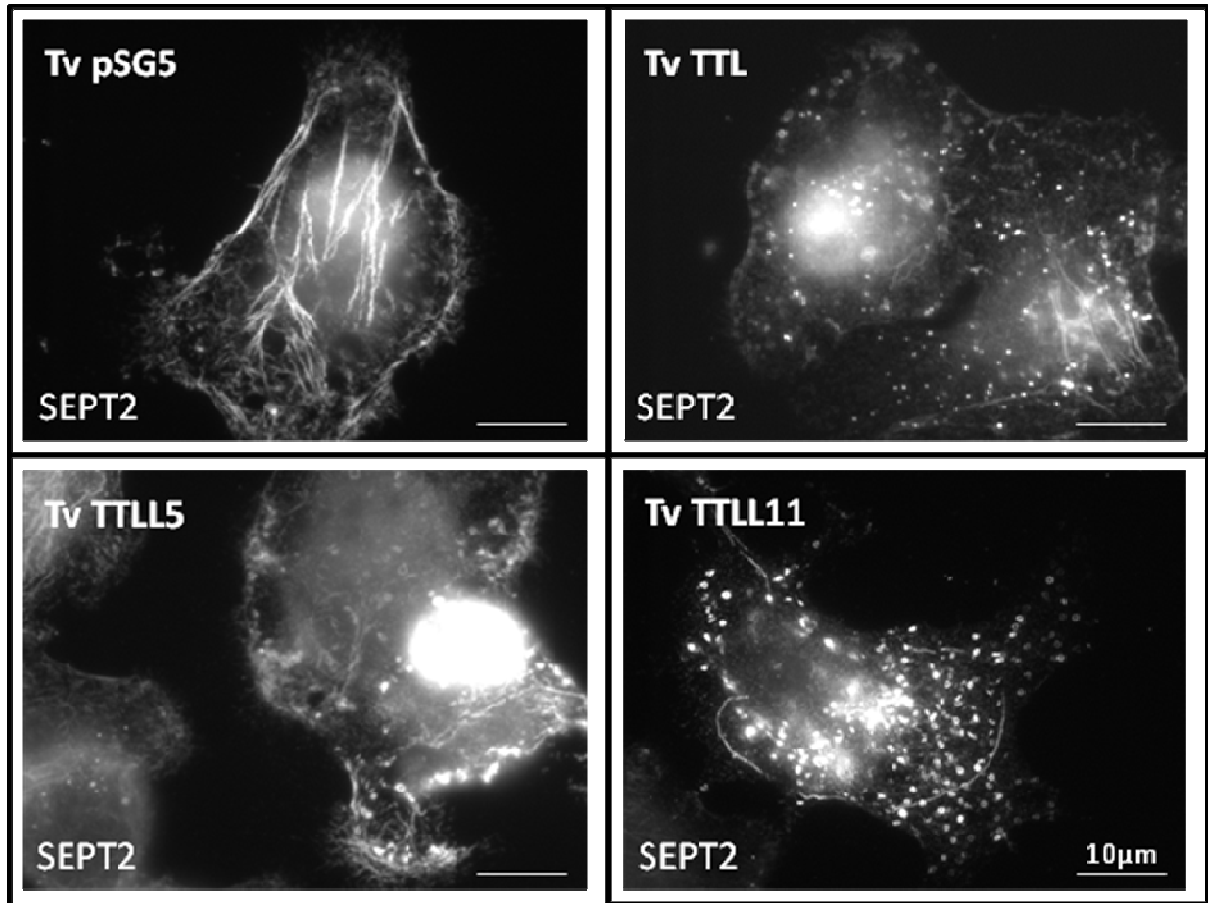
### **VI.3. Influence d'une surexpression de polyglutamylases et de la tyrosine ligase sur le recrutement des septines sur les microtubules**

La surexpression de la polyglutamylase initiatrice TTLL5 induisant une résistance des cellules Tv à 10nM de Taxol, nous avons alors cherché à savoir si cette surexpression avait un impact sur le recrutement des septines sur les microtubules. L'analyse par Western blot de l'accumulation des septines après surexpression de TTLL5 montre une augmentation de SEPT2, SEPT9\_v4 et de SEPT11 dans les fractions microtubulaires des cellules sensibles Tv, sans réelle modification du recrutement de SEPT9\_v1-3 (Figure 72). Dans les cellules résistantes T8, aucun changement de recrutement de septines n'a été observé comparativement aux cellules transfectées avec le plasmide contrôle pSG5.

De façon intéressante, la surexpression de TTLL11, qui entraîne une plus grande polyglutamylation de la tubuline et une résistance au Taxol des cellules sensibles Tv, met également en évidence un recrutement accru de SEPT2, SEPT9 (v1-3 et v4) et de SEPT11 dans les fractions microtubulaires (Figure 72). Dans les cellules T8, cette surexpression, qui est à l'origine d'une énorme augmentation de la longueur des chaînes de glutamate, entraîne une augmentation de recrutement sur les microtubules des septines 2 et 11, aboutissant néanmoins à une moindre résistance des cellules à 25nM de Taxol.

Quant à la tubuline tyrosine ligase TTL, sa surexpression entraîne un recrutement accru de SEPT2, SEPT9\_v1-3 et SEPT11 dans les fractions microtubulaires des cellules sensibles Tv, alors qu'elle est à l'origine d'une diminution de l'accumulation de toutes les septines dans les fractions microtubulaires des cellules résistantes T8 (Figure 72).





**Figure 73 : Perturbation de la localisation de SEPT2 par surexpression des polyglutamylases TTLL5 et TTLL11 et de la tubuline tyrosine ligase TTL dans les cellules sensibles Tv**

Marquage en immunofluorescence de SEPT2 dans les cellules sensibles après transfection transitoire des polyglutamylases TTLL5 et TTLL11, de la tyrosine ligase TTL, et du contrôle pSG5.

#### **VI.4. Influence d'une surexpression de polyglutamylases et de la tubuline tyrosine ligase sur la localisation subcellulaire des septines**

Dans les cellules sensibles Tv, nous avons précédemment mis en évidence la localisation de SEPT2 au niveau des fibres d'actine.

Si la surexpression des polyglutamylases TTLL5 et TTLL11 et de la tubuline tyrosine ligase TTL induit une augmentation de la quantité des septines dans les fractions microtubulaires des cellules sensibles Tv d'après nos résultats de Western blot (Figure 74), des filaments de SEPT2 sont-ils visibles au niveau microtubulaire?

Une étude préliminaire de marquage en immunofluorescence de SEPT2 après surexpression de ces enzymes dans les cellules sensibles Tv montre que SEPT2 est encore retrouvée au niveau des fibres d'actine, mais de façon moins importante que dans les cellules transfectées avec le plasmide pSG5 contrôle (Figure 73). On peut d'ailleurs observer quelques anneaux et agrégats de SEPT2 dans le cytoplasme.

Cette désorganisation partielle de SEPT2 est également observée après surexpression de TTL, toujours dans les cellules sensibles (Figure 73).

Quant à la surexpression de la polyglutamylase élongatrice TTLL11, elle induit une désorganisation complète de SEPT2 dans les cellules sensibles, qui ne se retrouve plus que sous forme d'anneaux non associés aux fibres d'actine (Figure 73).

## VII. DISCUSSION

**Non seulement localisées au niveau des microtubules chez les cellules résistantes, les septines seraient recrutées plus précisément sur les microtubules polyglutamylés**, comme cela a déjà été observé dans le trafic vésiculaire (Spiliotis *et al.* 2008), suggérant une implication potentielle de cette modification post-traductionnelle dans leur recrutement de septines sur les polymères polyglutamylés de tubuline. L'impact des modifications post-traductionnelles de tubuline a déjà été mis en évidence dans le recrutement de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation (pour revue : Hammond *et al.* 2008). C'est le cas notamment de l'acétylation, qui en favorisant le recrutement de la chaperonne HSP90 sur les microtubules, stimule la voie Akt ou eNOS, comme cela a été montré au laboratoire (Giustiniani *et al.* 2009a; Giustiniani *et al.* 2009b). De même, la tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline favorise le recrutement au bout (+) du microtubule non seulement du facteur de sauvetage CLIP-170 (Peris *et al.* 2006) mais également de la kinésine dépolymérisante MCAK (Peris *et al.* 2006). Quant à la polyglutamylation, elle régulerait de manière sélective les interactions des MAPs et des moteurs moléculaires avec les microtubules, notamment par la longueur des chaînes polyglutamylées (Janke *et al.* 2008). Dans le cas de la protéine tau, il a été montré que son affinité pour la tubuline s'accroît en fonction du nombre de résidus glutamate (trois résidus correspondant à l'affinité optimale) puis décroît lorsque les chaînes polyglutamylées s'allongent au-delà de quatre résidus (Boucher *et al.* 1994).

L'effet du Taxol sur le degré de polyglutamylation de la tubuline a été étudié sur des cellules HeLa (Audebert *et al.* 1993) et les résultats ont montré que le Taxol n'a pas d'effet sur le degré de polyglutamylation de l' $\alpha$ -tubuline, alors qu'il semble stimuler celle de la  $\beta$ -tubuline. Si aucune étude n'a suggéré l'implication de la polyglutamylation dans la résistance au Taxol, il a en revanche déjà été observé une augmentation de la polyglutamylation de l' $\alpha$ -tubuline dans une lignée cellulaire cancéreuse prostatique humaine (DU145) résistante à l'estramustine (E4) (Sangrajrang *et al.* 1998). De même, l'accumulation de tubuline tyrosinée a également été observée dans des cellules MCF-7 rendues résistantes de façon chronique à 30nM de Taxol (Banerjee 2002). Le Taxol ayant une affinité plus élevée pour la tubuline tyrosinée comparativement à la tubuline détyrosinée (Banerjee and Kasmala 1998), l'implication de la tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline dans la résistance au Taxol ne peut être expliquée par une différence d'affinité (Banerjee 2002), comme c'est le cas pour l'isotype de  $\beta$ III-tubuline (Panda *et al.* 1994).

**De manière intéressante, l'implication de la polyglutamylation et de la tyrosination de la tubuline dans la restauration de la sensibilité au Taxol des cellules résistantes T8 semble dépendre de la longueur de la chaîne polyglutamylée.** Comme observée suite à l'inhibition partielle de l'expression des septines, une sensibilité au Taxol des cellules T8 a pu être restaurée, à la fois en inhibant partiellement l'expression de la tubuline tyrosine ligase TTL, mais aussi en surexprimant les déglutamylases CCP1 et CCP5, qui raccourcit et débranche respectivement les chaînes latérales polyglutamylées. L'inhibition partielle de l'expression de TTL, qui semble restaurer la sensibilité des cellules T8 en régulant la longueur des chaînes polyglutamylées, engendre également une inhibition du recrutement des septines sur les microtubules des cellules résistantes (Figure 67). De même, la surexpression de la déglutamylase CCP5 débranchante (et dans une moindre mesure celle de la déglutamylase CCP1), en réduisant fortement le degré de polyglutamylation des microtubules, empêche le recrutement des septines sur les microtubules des cellules T8 (Figure 68), induisant alors une restauration de la sensibilité au Taxol de ces cellules. Ces résultats sont confirmés par la désorganisation de SEPT2 observée en immunomarquage chez les T8 surexprimant CCP5. Cependant, l'inhibition partielle de l'expression des septines, qui n'a aucun effet ni sur le niveau d'accumulation des courtes chaînes polyglutamylées ni sur celui de la tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline, semble inhiber l'accumulation sur le microtubule de longues chaînes latérales polyglutamylées, en accord avec les données de la littérature (Spiliotis *et al.* 2008). Inversement, une résistance partielle au Taxol a pu être instaurée chez les cellules sensibles Tv en surexprimant les polyglutamylases TTLL5 et TTLL11, ce qui a été associé à un recrutement accru des septines dans les fractions microtubulaires des cellules Tv (Figure 72). Sachant que les TTLLs, préférentiellement initiatrices ou élongatrices, sont capables de catalyser les deux réactions enzymatiques (van Dijk *et al.* 2007), la surexpression des TTLLs dans nos cellules sensibles pourrait entraîner une saturation de leur réaction préférentielle (initiation ou élongation) et la surexpression d'une TTLL initiatrice avoir des effets d'une polyglutamylase élongatrice, et inversement. Ainsi, on peut imaginer que la surexpression de TTLL5 initiatrice ou de TTLL11 élongatrice, également capable de réaliser, respectivement, une réaction d'élongation ou d'initiation, puissent avoir des effets similaires, à savoir un recrutement accru des septines sur les microtubules, à l'origine très peu polyglutamylés, des cellules sensibles Tv. La surexpression de la tyrosine ligase TTL n'a en revanche pas d'effet sur la sensibilité au Taxol des cellules Tv (Figure 71), indiquant que la tyrosination, même si elle est impliquée, n'est pas suffisante pour induire une résistance au Taxol. Par ailleurs, dans des cellules résistantes T8, déjà tyrosinées, il est possible que la surabondance de tyrosination, due à la surexpression de TTL, augmente la longueur des chaînes polyglutamylées au-delà de 6 résidus, empêchant ou perturbant alors le recrutement des septines sur les microtubules.

Ces résultats suggèrent un rôle particulièrement important de la longueur des chaînes polyglutamylées dans la régulation du recrutement des septines sur les microtubules des cellules résistantes et donc la mise en place d'une résistance au Taxol.

L'augmentation de la polyglutamylation et de la tyrosination a déjà été associée à des phénotypes chimiorésistants (Sangrajrang *et al.* 1998; Banerjee 2002), mais aucune étude n'a à ce jour décrit de mécanisme de chimiorésistance impliquant les enzymes responsables de ces modifications post-traductionnelles. En revanche, l'observation d'un taux anormalement élevé de polyglutamylation dans le cerveau de la souris *pcd*, atteinte de dégénérescence neuronale, a été associée à la perte de CCP1 (Fernandez-Gonzalez *et al.* 2002), et a révélé qu'une régulation stricte de la polyglutamylation par les enzymes de déglutamylation était indispensable à la survie neuronale (Moutin *et al.* 2011). Cet excès de polyglutamylation a pu être contrecarré en réduisant l'expression de l'enzyme TTLL1 (Janke *et al.* 2008), empêchant alors la survenue d'une dégénérescence (Rogowski *et al.* 2010). Par ailleurs, d'autres expériences ont permis de comprendre l'importance des TTLLs dans les maladies neurodégénératives. La mutation de la sous-unité pGS1 de TTLL1 chez la souris ROSA22, diminuant le niveau de polyglutamylation de l' $\alpha$ -tubuline, provoque une perturbation de la distribution de la kinésine KIF1A, requise pour une transmission synaptique continue (Ikegami *et al.* 2007). De même, il a été montré que l'inhibition de l'expression de TTLL7, une polyglutamylase à la fois initiatrice et élongatrice de  $\beta$ -tubuline, diminuait la glutamylation de la  $\beta$ -tubuline et causait une déficience des neurites dans les cellules PC12 (Ikegami *et al.* 2006). En revanche, seulement deux études, à ce jour, reportent l'implication d'une modulation d'expression de polyglutamylases dans le cancer. En effet, il a été montré que la surexpression de la polyglutamylase TTLL4 qui, en induisant la polyglutamylation de la protéine d'échafaudage PELP1, serait impliquée dans la coordination du remodelage de la chromatine dans le cancer du pancréas (Kashiwaya *et al.*). Une augmentation de la polyglutamylation de la tubuline a également été révélée dans le cancer de la prostate (Soucek *et al.* 2006). Enfin, l'inhibition de l'expression de TTLL6 chez le poisson zèbre inhibe l'assemblage des cils olfactifs (Pathak *et al.* 2007).

En ce qui concerne la tubuline tyrosine ligase TTL, un faible niveau d'expression dans des cellules NIH-3T3 a été corrélé à une tumorigenèse plus importante, à une invasivité tumorale plus élevée, ainsi qu'à un mauvais pronostic (Lafanechere *et al.* 1998; Mialhe *et al.* 2001), ce qui semble contradictoire avec nos résultats.

**Bien que les résultats de Western blot précédents montrent que l'initiation de chaînes latérales polyglutamylées et la tyrosination permettent de recruter la plupart des septines sur les microtubules des cellules sensibles, les résultats d'immunofluorescence mettent surtout en évidence une désorganisation de SEPT2, qui est partiellement délocalisée des fibres d'actine**

**lorsque TLL5 et TTL sont surexprimées mais ne démontrent pas une relocalisation sur les microtubules.** Ce phénomène est amplifié lors de la génération de longues chaînes polyglutamylées (transfection de TLL11), où SEPT2 apparaît alors entièrement organisée sous forme d'anneaux, comme dans les expériences où le cytosquelette d'actine a été dépolymérisé par la cytochalasine B.

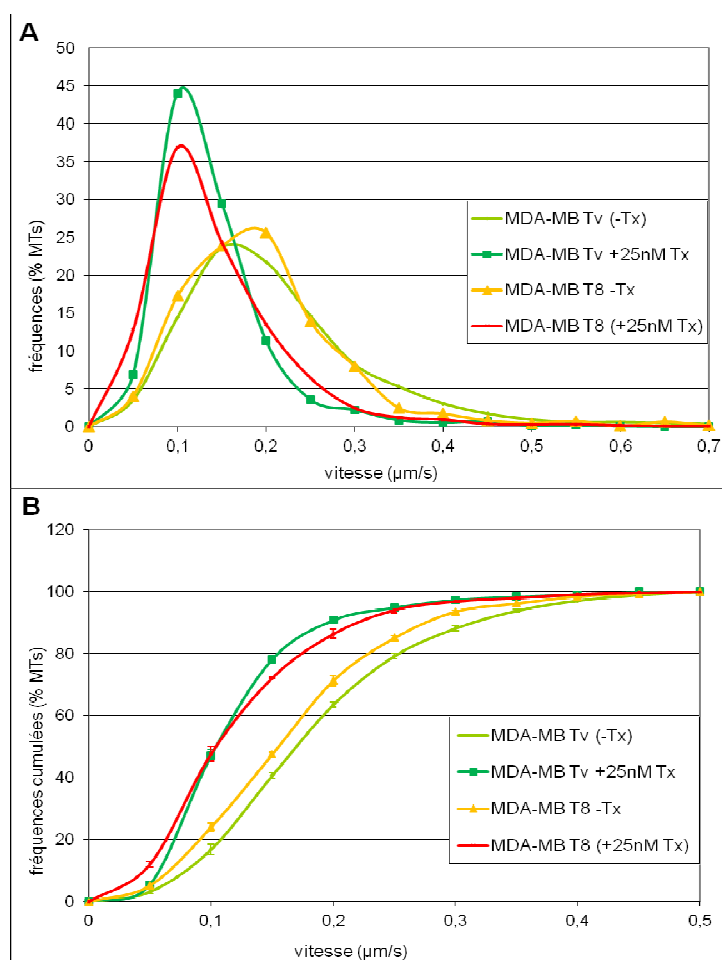
Il est possible que les longues chaînes polyglutamylées induisent le décrochage de SEPT2 des fibres d'actine, mais que la présence d'une protéine adaptatrice soit nécessaire pour le recrutement des filaments de septines sur les microtubules des cellules sensibles, par analogie avec la protéine adaptatrice anilline impliquée dans le recrutement des filaments de septines au niveau de l'actine (Kinoshita *et al.* 2002).

Même si un lien a déjà été établi entre la chimiorésistance et les septines ou les septines et la polyglutamylation, aucune étude n'a jamais relié ces trois éléments. Si la longueur de la chaîne polyglutamylée est capable de réguler l'interaction de certaines MAPs impliquées dans la stabilisation des microtubules, le recrutement des septines sur les microtubules polyglutamylés permet-il de récupérer une certaine dynamique microtubulaire, responsable du phénotype chimiorésistant ?

**Tableau XXXIII : Données des mesures de Vitesses de polymérisation des microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8 en présence ou en absence de Taxol**

	Nombre de cellules	Nombre de pentes	Moyenne (en $\mu\text{m/s}$ ) $\pm$ s.e.m.	Variation des moyennes (p value)	Variation des moyennes (p value)	Variation des moyennes (p value)
<b>Tv (-Taxol)</b>	40	2970	<b>0,193</b> $\pm$ 0,002	#		
<b>Tv + Taxol</b>	25	1678	<b>0,115</b> $\pm$ 0,001	<b>-40,4%</b> (p<0,001)	#	
<b>T8 -Taxol</b>	18	1228	<b>0,172</b> $\pm$ 0,003	-10,6% (p<0,001)	<b>50,0%</b> (p<0,001)	#
<b>T8 (+Taxol)</b>	49	2834	<b>0,121</b> $\pm$ 0,002	<b>-37,3%</b> (p<0,001)	5,3% (p=0,10)	<b>-29,8%</b> (p<0,001)

Les variations des moyennes reportées dans le tableau sont comparées à la vitesse mesurée pour les cellules annotées # de la même colonne



**Figure 74 : Vitesse de croissance des microtubules des cellules Tv et T8 en absence et en présence de Taxol**

**A** : courbe de distribution des fréquences de microtubules (en %) en fonction de la vitesse de croissance (en  $\mu\text{m/s}$ ), **B** : courbe des fréquences cumulées de microtubules (en %) en fonction de la vitesse de croissance (en  $\mu\text{m/s}$ ). Pour les courbes A et B, chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. pour le nombre de cellules et de comètes reportées dans le tableau ci-dessus.

## **PARTIE V : INFLUENCE DES SEPTINES ET/OU DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA TUBULINE SUR LA DYNAMIQUE MICROTUBULAIRE**

Un des mécanismes par lequel les cellules résistantes contrent l'effet stabilisateur du Taxol est l'accélération de leur dynamique microtubulaire (Goncalves *et al.* 2001). Plusieurs paramètres entrent en jeu dans la mesure de la dynamique microtubulaire, comme notamment les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation du microtubule, ainsi que les fréquences de catastrophes et de sauvetages (Howard and Hyman 2009).

### **I. INFLUENCE DU TAXOL SUR LA VITESSE DE CROISSANCE MICROTUBULAIRE**

La vitesse de polymérisation des microtubules est un des paramètres caractérisant la dynamique microtubulaire. En transfectant de manière transitoire la protéine de bout (+) EB1 dans les cellules Tv et T8, nous avons mesuré par des kymographes les vitesses de croissance des microtubules en présence ou en absence de Taxol (Figure 74).

Quel que soit le traitement (+ ou – Taxol) et quelle que soit la lignée (Tv ou T8), les courbes de distribution des fréquences de microtubules en fonction de la vitesse de croissance montrent que nous sommes en présence d'une population unique de cellules, répondant toutes majoritairement de la même manière (Figure 74 A). Ainsi, un traitement pendant 24h des cellules sensibles avec 25nM de Taxol (Tv+Taxol) entraîne un ralentissement significatif, dû à l'effet stabilisateur du Taxol, de 40% de la vitesse de croissance microtubulaire (0,115 $\mu$ m/s) comparativement aux cellules Tv cultivées habituellement sans Taxol Tv(-Taxol), atteignant sensiblement celle mesurée chez les cellules T8 (0,121 $\mu$ m/s), cultivées en permanence en présence de 25nM de Taxol (T8 (+Taxol)) (Tableau XXXIII et Figure 74 B). A l'inverse, en absence de Taxol pendant 24h, la vitesse moyenne de croissance des microtubules des cellules résistantes (T8-Taxol) augmente significativement d'environ 30% (0,172 $\mu$ m/s) comparativement aux cellules T8 (+Taxol), atteignant quasiment celle mesurée chez les cellules sensibles habituellement cultivées sans Taxol (Tv-Taxol) (0,193 $\mu$ m/s) (Tableau XXXIII). Cette différence de 10% mesurée entre les vitesses de croissance microtubulaire des cellules Tv et T8 en absence de Taxol (Tv (-Taxol) et T8-Taxol) est statistiquement significative, mais il est peu probable qu'elle ait une signification biologique.

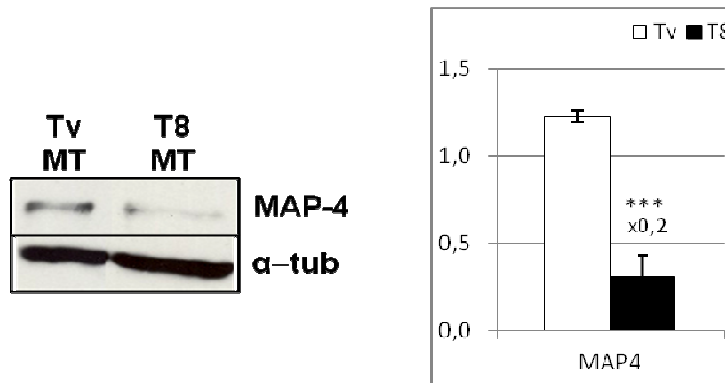


## II. MODULATION DU RECRUTEMENT SUR LES MICROTUBULES DE MAP4

### II.1. Diminution du recrutement de la protéine stabilisatrice MAP4

Le rôle de certaines protéines associées aux microtubules, comme la protéine stabilisatrice MAP4, dans la modulation de la dynamique microtubulaire a été largement documenté. Il est donc apparu important de chercher à savoir si le recrutement de certaines de ces protéines régulatrices était modifié ou pas dans notre lignée résistante.

L'analyse par Western Blot de fractions microtubulaires de cellules Tv et T8 révèle en effet une diminution de 80% du recrutement de la protéine stabilisatrice MAP4 sur les microtubules des cellules T8 (Figure 75), concordant avec l'hypothèse d'une récupération d'une dynamique microtubulaire dans notre lignée résistante.



**Figure 75 : Diminution du recrutement de MAP4 sur les microtubules des cellules résistantes T8**

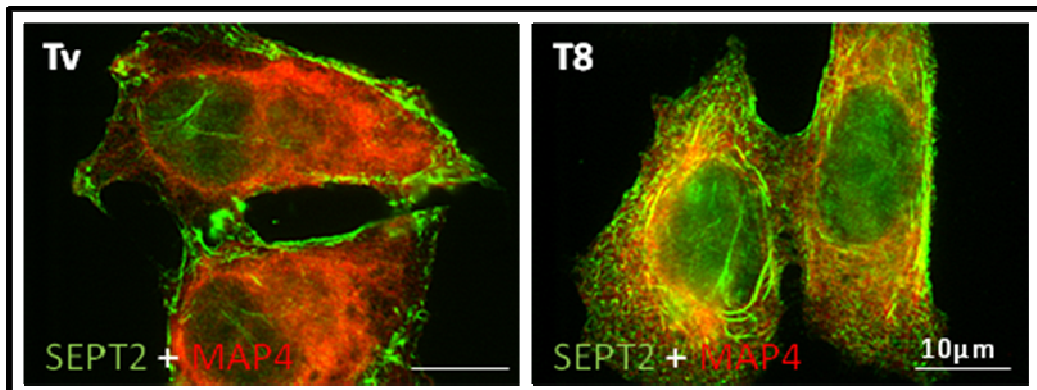
Analyse par Western Blot du recrutement de la protéine associée aux microtubules MAP4 sur les microtubules (MT) de cellules Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme marqueur de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 4 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \*\*\* correspond à  $p < 0,001$ .

### II.2. Déstabilisation des microtubules par interaction entre MAP4 et les septines

Il a été proposé dans des cellules de mammifères que les septines étaient capables de réguler la stabilité des microtubules en interagissant directement avec la protéine stabilisatrice MAP4 (Kremer *et al.* 2005). Cette étude suggère que les septines empêchent la liaison de MAP4 au microtubule *in vitro*.

Dans nos cellules sensibles et résistantes, un double marquage en immunofluorescence de SEPT2 avec MAP4 montre une absence de colocalisation entre ces deux protéines (Figure 76). En effet, le marquage de MAP4 semble diffus dans le cytoplasme (ressemblant tout au plus à un marquage microtubulaire en périphérie cellulaire) des cellules Tv, dans lesquelles SEPT2 colocalise avec les fibres d'actine ainsi qu'avec l'actine corticale (Figure 48). Dans les cellules T8, où les septines sont recrutées sur les microtubules (Figure 48), le marquage de MAP4, beaucoup moins prononcé, semble

s'intercaler avec celui de SEPT2, suggérant que ces deux protéines seraient localisées sur des régions différentes du microtubule.



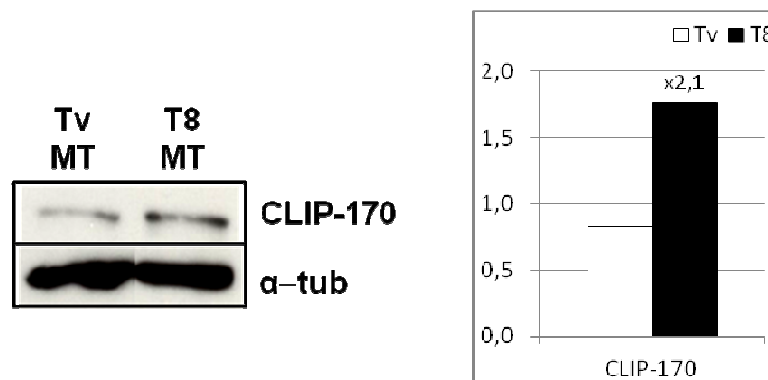
**Figure 76 : Absence de colocalisation entre MAP4 et SEPT2 dans les cellules sensibles Tv et résistantes T8**  
Double marquage en immunofluorescence de SEPT2 (en vert) et de MAP4 (en rouge) dans les cellules Tv et T8

### III. ANALYSE DU RECRUTEMENT DU FACTEUR DE SAUVETAGE CLIP-170 ET DE LA KINESINE DEPOLYMERISANTE MCAK

#### III.1. Augmentation du recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170

Contrairement aux MAPs stabilisatrices de microtubules, la protéine CLIP-170 s'associe par son domaine N-terminal à l'extrémité (+) des microtubules (Perez *et al.* 1999), lui permettant d'exercer sa fonction de facteur de sauvetage des microtubules (Komarova *et al.* 2002a).

L'analyse par Western Blot de fractions microtubulaires de cellules Tv et T8 révèle une augmentation d'environ un facteur 2 du recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 sur les microtubules des cellules résistantes (Figure 77).



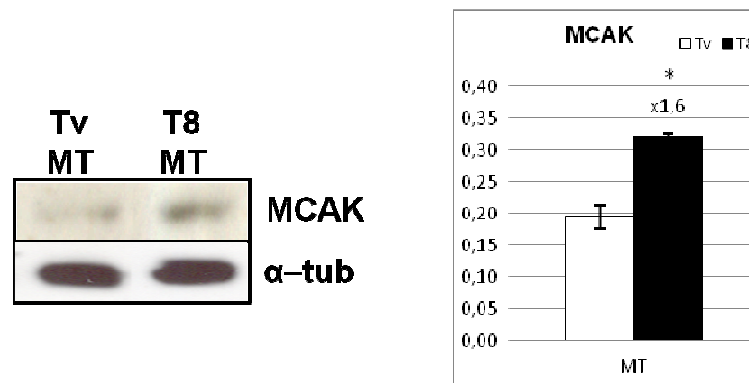
**Figure 77 : Augmentation du recrutement de CLIP-170 sur les microtubules des cellules résistantes T8**

Analyse par Western Blot du recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 sur les microtubules (MT) de cellules Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme marqueur de charge protéique.

### III.2. Augmentation du recrutement de la kinésine dépolymérisante MCAK

Dans la grande famille des kinésines, la kinésine MCAK est une dépolymérase de microtubules ATP-dépendante, qui agit comme un facteur de catastrophe (Newton *et al.* 2004) et favorise donc la dépolymérisation des microtubules (Peris *et al.* 2009).

Des immunoblots réalisés sur des fractions microtubulaires de cellules Tv et T8 révèle une augmentation du recrutement, également d'un facteur 1,6, de la kinésine dépolymérisante MCAK sur les microtubules des cellules résistantes (Figure 78).



**Figure 78 : Augmentation du recrutement de MCAK sur les microtubules des cellules résistantes**

Analyse par Western Blot du recrutement de la kinésine dépolymérisante MCAK sur les microtubules (MT) de cellules Tv et T8, avec quantification sous forme d'histogrammes des densités intégrées des bandes. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme marqueur de charge protéique. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 2 expériences. Les comparaisons ont été réalisées avec un test t de Student. \* correspond à  $p < 0,05$ .

## IV. DISCUSSION

**Bien que les vitesses de croissance des microtubules des cellules sensibles Tv et résistantes T8, cultivées en absence ou en présence de Taxol, soient similaires, on ne peut pas rejeter l'hypothèse selon laquelle les cellules résistantes contrent l'effet stabilisateur du Taxol en accroissant leur dynamique microtubulaire.** En effet, la vitesse de croissance n'étant qu'un paramètre de la dynamique microtubulaire, des expériences complémentaires visant à mesurer d'autres paramètres, tels que les vitesses de dépolymérisation des microtubules, ou les fréquences de catastrophes et de sauvetages sont nécessaires et déjà en cours. En effet, une étude des paramètres d'instabilité dynamique menée sur des cellules pulmonaires A549-T12 résistantes au Taxol révèle que ce sont principalement la vitesse de dépolymérisation et la fréquence de catastrophes des microtubules, augmentant respectivement de 59 et 24% par rapport aux cellules sensibles, qui sont responsables de la récupération d'une dynamique appropriée à l'origine de la survie des cellules résistantes (Goncalves *et al.* 2001). Il a par ailleurs été montré que l'incorporation des isotypes de  $\beta$ III- et  $\beta$ IV-tubuline, en

modulant la liaison du Taxol, permettait d'accroître la dynamique microtubulaire, ce qui permet le développement d'un phénotype chimiorésistant (Derry *et al.* 1997).

**Parallèlement à l'étude des différents paramètres d'instabilité dynamique des microtubules des cellules Tv et T8, nous observons une modulation du recrutement sur les microtubules de certaines protéines. Nous avons notamment mis en évidence une diminution du recrutement de la protéine stabilisatrice de microtubules MAP4 sur les microtubules des cellules T8 ainsi qu'une augmentation de l'accumulation du facteur de sauvetage CLIP-170 et de la kinésine dépolymérisante MCAK, qui pourraient être à l'origine d'une certaine restauration de la dynamique microtubulaire chez la lignée MDA-MB 231 résistante.**

MAP4 est une protéine stabilisatrice qui augmente la fréquence de sauvetages sans décroître la fréquence de catastrophes (Holmfeldt *et al.* 2002). La phosphorylation de MAP4 par les kinases cdk2 ou MARK/Par-1, induisant son inactivation, inhibe sa liaison ou entraîne sa dissociation des microtubules, favorisant notamment le déroulement de la mitose (Olmsted 1986; Poruchynsky *et al.* 2001; Honore *et al.* 2005). De plus, la phosphorylation de MAP4 et sa dissociation consécutive des microtubules ont été reliées à une diminution de la sensibilité au Taxol de lignées cellulaires de cancer ovarien résistantes (Poruchynsky *et al.* 2001). Par ailleurs, les septines empêcheraient la liaison de MAP4 aux microtubules mais seraient incapables d'induire sa dissociation du polymère (Kremer *et al.* 2005). Dans nos cellules résistantes, les septines seraient donc à l'origine de la faible accumulation de MAP4 sur les microtubules, contribuant ainsi à une certaine restauration de l'instabilité dynamique des microtubules. Cependant, la localisation spécifique des septines, non plus sur les fibres d'actine mais sur les microtubules dans notre lignée résistante, doit avoir d'autres impacts sur la régulation de la dynamique microtubulaire que juste d'empêcher la liaison de MAP4.

La protéine CLIP-170 s'associe *in vivo* à l'extrémité (+) des microtubules (Perez *et al.* 1999), où elle exerce sa fonction de facteur de sauvetage des microtubules (Komarova *et al.* 2002a). Il a été montré que CLIP-170, tout comme d'autres +TIPs, se liait de manière plus efficace aux microtubules tyrosinés (Peris *et al.* 2006). L'augmentation du recrutement de CLIP-170 sur les microtubules et de la tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline, observée dans nos cellules, pourrait alors contribuer à une certaine récupération de la dynamique microtubulaire.

MCAK est un moteur moléculaire dont la liaison au bout (+) catalyse le désassemblage des microtubules (Desai and Mitchison 1997). Une très récente étude a de plus montré que la surexpression de MCAK dans des cellules ovariennes CHO augmentait également la fréquence de détachement des microtubules du centromère (Ganguly *et al.* 2011a), ce qui entraîne une diminution de la quantité de tubuline polymérisée permettant ainsi de conférer une résistance au Taxol (Ganguly

*et al.* 2011b). Par ailleurs, il a également été montré que MCAK interagissait préférentiellement, comme CLIP-170, avec les microtubules tyrosinés (*Peris et al.* 2006).

Bien que des études supplémentaires de mesure de la dynamique microtubulaire soient indispensables, il apparaît que la localisation des septines sur les microtubules soit à l'origine d'une modification de recrutement d'au moins trois protéines, MAP4, CLIP-170 et MCAK, connues pour être impliquées dans la régulation de la dynamique microtubulaire.

Ces résultats concourent en faveur de l'hypothèse selon laquelle la résistance au Taxol des cellules T8 implique une restauration de la dynamique microtubulaire, résultant d'une augmentation du niveau de polyglutamylation et de tyrosination de la tubuline, et du recrutement accru des septines sur les microtubules, hypothèse qui sera développée dans la discussion générale.

# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Le cancer du sein est une cause importante de mortalité féminine en France et l'émergence de chimiorésistance, en particulier avec les taxanes, dont le paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), est une limite importante à l'emploi de ces molécules. Le Taxol reste cependant très largement utilisé en deuxième ligne thérapeutique, justifiant que de nombreuses études s'intéressent à l'élucidation des mécanismes impliqués dans le phénomène de chimiorésistance. Comme de nombreux anticancéreux, les taxanes ciblent les microtubules (Calligaris *et al.* 2010), des polymères d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline intervenant dans de nombreuses fonctions cellulaires (Nogales 2000). Ces derniers alternent entre des phases de polymérisation et de désassemblage, leur conférant ainsi un caractère dynamique. En se liant à la  $\beta$ -tubuline, le Taxol stabilise les microtubules et bloque la mitose, conduisant les cellules vers l'apoptose (Orr *et al.* 2003). La résistance au Taxol est un processus multifactoriel impliquant des mécanismes tels que la surexpression de pompes d'efflux (P-glycoprotéine), des mutations des gènes d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline, ou une expression altérée de protéines associées aux microtubules telles que MAP4, stabilisatrice de microtubules, ou la stathmine, dépolymérisante, contribuant ainsi à la restauration de la dynamique microtubulaire (McGrogan *et al.* 2008).

L'objectif de ce travail a été d'explorer les variations de recrutement sur les microtubules des protéines présentes dans l'environnement de ces polymères de tubuline afin de mettre en évidence d'autres mécanismes cellulaires, à l'origine de la résistance au Taxol, plus ou moins directement liés à une restauration de dynamique microtubulaire.

Le projet repose sur l'emploi de la lignée tumorale mammaire MDA-MB 231 rendue résistante par paliers à 25nM de Taxol (palier T8) dans des conditions de blocage des pompes d'efflux. La concentration de Taxol utilisée, se situant dans l'index thérapeutique (Liebmann *et al.* 1993), est donc biologiquement pertinente. Le choix de l'acquisition d'une résistance lente et progressive avait pour objectif d'orienter notre étude de la compensation des effets stabilisateurs du Taxol vers des régulations de la dynamique des microtubules, sans doute assez lentes à se mettre en place et qu'un traitement ponctuel à une forte concentration de Taxol ne permettrait pas. Comme il a déjà été décrit dans plusieurs études de la chimiorésistance, nos cellules résistantes T8 surexpriment les isotypes  $\beta$ III et  $\beta$ IV de tubuline. Déjà reliés à la résistance au Taxol, principalement en réduisant son affinité pour la tubuline (Derry *et al.* 1997; Kavallaris *et al.* 1997; Hari *et al.* 2003), l'incorporation de ces isotypes de  $\beta$ -tubuline dans les microtubules contribue certainement en partie au phénotype chimiorésistant de nos cellules T8 mais d'autres modifications d'expression protéique ou de recrutement sur les microtubules ont aussi été observées.

Une diminution du recrutement sur les microtubules de certaines protéines impliquées dans l'apoptose, à savoir la survivine et une forme tronquée de P53, a été mise en évidence dans les fractions microtubulaires des cellules résistantes T8. Contrairement aux résultats que nous avons obtenus, certaines données cliniques ont révélé une surexpression de la survivine, qui a été associée à une baisse du taux de rémission clinique ou pathologique, suggérant un lien direct avec la résistance au



Taxol dans le cancer de l’ovaire (Zaffaroni *et al.* 2002). N’ayant analysé que son accumulation sur les microtubules, nous n’excluons pas cependant que son expression soit également augmentée dans nos extraits cellulaires. Par ailleurs, sachant qu’une inhibition de la survivine a été corrélée à une augmentation du nombre de microtubules nucléés et des phénomènes de catastrophes (Rosa *et al.* 2006), la diminution du recrutement de la survivine sur les microtubules des cellules résistantes T8 pourrait permettre de récupérer une certaine dynamique microtubulaire et ainsi contribuer à l’acquisition du phénotype chimiorésistant.

Une analyse protéomique comparative a été entreprise afin d’identifier les protéines de l’environnement des microtubules impliquées dans la résistance au Taxol des cellules MDA-MB 231. Plusieurs études protéomiques ont déjà été publiées, avec pour objectif également d’identifier des protéines ou des biomarqueurs de chimiorésistance (Brown and Fenselau 2004; Gehrmann *et al.* 2004; Chuthapisith *et al.* 2007), mais elles ont toutes été réalisées sur des lysats cellulaires. En se limitant à une fraction subcellulaire telle que l’environnement des microtubules, les protéines différenciellement exprimées pourraient davantage refléter des mécanismes d’adaptation ciblant la dynamique microtubulaire dans les cellules résistantes T8. Au cours de cette étude comparative, une augmentation de la proportion d’ $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline (par rapport à la totalité des protéines de l’environnement microtubulaire isolées) a été observée comme attendu, le Taxol favorisant la forme polymérisée de la tubuline. L’augmentation des isotypes III et IV de  $\beta$ -tubuline, déjà décrite précédemment, a d’ailleurs été confirmée dans cette étude. Une modulation de l’accumulation sur les microtubules de deux moteurs moléculaires, la kinésine-1 et la dynéine, a également été mise en évidence, dont l’augmentation et la diminution respective pourraient jouer un rôle dans la restauration d’une dynamique microtubulaire dans les cellules résistantes T8. Il a en effet été montré au laboratoire que la kinésine-1 et JNK, impliqués dans une même voie de signalisation, stimulent l’élongation des microtubules, et participent, en coopération avec le facteur de sauvetage CLIP-170, à l’élaboration et au maintien du cytosquelette de microtubules au sein de la cellule (Daire *et al.* 2009).

De manière intéressante, la surexpression et le recrutement accru sur les microtubules de plusieurs membres de la famille des septines (Figure 46) ont été mis en évidence dans notre étude protéomique différentielle, suggérant un rôle potentiel de ces protéines dans l’acquisition de la résistance au Taxol. Les septines sont des protéines impliquées dans la cytokinèse (Kinoshita and Noda 2001), mais également dans l’organisation des cytosquelettes d’actine et de microtubules (Surka *et al.* 2002; Nagata *et al.* 2003) et dans le trafic membranaire (Spiliotis *et al.* 2008). Plus précisément, nos résultats ont révélé une surexpression et un recrutement accru des septines 2, 8, 9 et 11 sur les microtubules des cellules résistantes T8. Une surexpression de septines a déjà été décrite dans certaines maladies

neurodégénératives. En effet, trois septines au moins sont impliquées dans la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer en formant des complexes hétéro-polymériques interagissant directement ou indirectement avec les agrégats de tau (Kinoshita *et al.* 1998).

Un lien a également été établi entre plusieurs septines et le cancer. Si SEPT4 et SEPT10 sont significativement inhibées dans plusieurs cancers, dont le cancer du sein, il s'avère que les quatre septines que nous retrouvons dans notre étude comparative (SEPT2, 8, 9 et 11) sont significativement surexprimées dans la plupart des cancers, dont le cancer du sein (Sakai *et al.* 2002; Liu *et al.* 2010a). Bien que significativement surexprimées dans les cellules résistantes T8, ces quatre septines sont également présentes dans les cellules sensibles Tv et il est possible que leur expression dans nos cellules sensibles soit elle-même plus élevée comparativement à des cellules de tissu sain. La surexpression de plusieurs septines, et notamment de SEPT9, a de plus été associée à la progression tumorale et à différents stades et grades tumoraux avancés, et à un mauvais pronostic (Montagna *et al.* 2003; Liu *et al.* 2010a). Plus particulièrement, l'isoforme SEPT9\_v1 a été impliqué dans la transformation tumorale de cellules épithéliales mammaires (Gonzalez *et al.* 2007) en activant la voie JNK (Gonzalez *et al.* 2009). De plus, plusieurs isoformes de SEPT9, et notamment SEPT9\_v1, sont surexprimés dans certaines lignées chimiorésistantes (Amir and Mabweesh 2007) et il s'agit d'ailleurs, à ce jour, de la seule septine impliquée dans la résistance au Taxol de cellules cancéreuses. De ce fait, la proportion de cet isoforme SEPT9\_v1 au sein d'une cellule ou sa stoechiométrie par rapport à d'autres isoformes joueraient un rôle critique dans la régulation de l'organisation des microtubules, de la mitose et de la cytokinèse (Gonzalez *et al.* 2007). Par ailleurs, une étude a très récemment suggéré que les septines servaient de guide à la croissance des microtubules en supprimant leurs catastrophes dans les régions périnucléaires et à la périphérie du cytoplasme dans les cellules épithéliales polarisées (Bowen *et al.* 2011). L'implication des septines dans le phénomène de chimiorésistance pourrait donc passer par une régulation de la dynamique microtubulaire.

Alors que des expériences d'immunofluorescence en double marquage confirment la localisation microtubulaire des septines dans les cellules résistantes T8 (Figure 48 et Figure 49), elles révèlent que les septines sont très majoritairement associées aux fibres de stress et à l'actine sous-corticale dans les cellules sensibles Tv. Cette localisation sur l'un ou l'autre élément de cytosquelette a déjà été observée dans différentes lignées cellulaires (pour revue : Silverman-Gavrila and Silverman-Gavrila 2008), et semble dépendre en partie de la surexpression de certains isoformes, et notamment de SEPT9\_v1 (Gonzalez *et al.* 2007). En effet, le recrutement accru de SEPT9\_v1 que nous retrouvons dans nos cellules résistantes T8 (Figure 53) pourrait en partie expliquer ce changement de localisation des filaments d'actine vers les microtubules, bien qu'il ait également été montré que la surexpression de SEPT9\_v1 entraîne une désorganisation du réseau de microtubules (Gonzalez *et al.* 2007).

Alors que la dépolymérisation des filaments d'actine dans les cellules sensibles entraîne une réorganisation des septines sous forme d'anneaux (sans perturber la localisation des septines sur les

microtubules des cellules résistantes), la dépolymérisation des microtubules provoque en revanche le désassemblage des complexes de septines et une localisation diffuse des septines dans le cytoplasme aussi bien des cellules sensibles que des cellules résistantes. Les microtubules semblent donc jouer un rôle important dans la formation des filaments de septines. Bien qu'il ait déjà été démontré que les septines étaient capables de former des filaments *in vitro* (Kinoshita *et al.* 2002; Versele and Thorner 2005), la compréhension de la polymérisation de ces filaments *in vivo* et de leur assemblage en structures plus complexes dans les cellules reste évasif (DeMay *et al.* 2010).

Les microtubules sont impliqués depuis longtemps dans diverses voies de signalisation (pour revue : Gundersen and Cook 1999). Non seulement la dépolymérisation ou la stabilisation des microtubules entraîne l'altération d'un grand nombre de fonctions cellulaires régulées par la signalisation (par exemple les voies JNK et MAPK), mais de nombreux facteurs impliqués dans la transduction de signal sont liés aux microtubules (dont certaines protéines G, la protéine adaptatrice EB1, ou le facteur de transcription P53). Enfin, les microtubules sont également la cible de certaines voies de signalisation. C'est le cas de l'EGF (Epidermal Growth Factor) et de l'hormone de croissance (Goh *et al.* 1998), dont les voies de signalisation aboutissent à une augmentation des polymères de tubuline. De plus en plus décrites dans la littérature, les modifications post-traductionnelles de tubuline ne correspondraient pas à une simple accumulation de modifications sur des polymères stables, à durée de vie longue, mais joueraient un rôle crucial dans le recrutement sur le microtubule de protéines impliquées dans diverses voies de signalisation (pour revue : Hammond *et al.* 2008). Il a notamment été montré au laboratoire, qu'une hyperacétylation de la tubuline, en conditions physiologiques, était impliquée dans le recrutement sur les microtubules de la protéine chaperonne Hsp90, et que ce recrutement influençait le fonctionnement de voies de signalisation mettant en jeu des protéines clientes d'Hsp90, aussi bien dans des cellules épithéliales avec Akt/PKB et p53 (Giustiniani *et al.* 2009b) que dans des cellules endothéliales avec eNOS (Giustiniani *et al.* 2009a). Il a en effet été mis en évidence qu'une hyperacétylation de la tubuline, favorisant le recrutement sur les microtubules des moteurs moléculaires kinésine et dynéine, permettait de compenser le déficit de transport dans les neurones du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) à l'origine de la maladie de Huntington (Reed *et al.* 2006; Dompierre *et al.* 2007). Longtemps considérée comme une modification post-traductionnelle qui ne s'accumule qu'au niveau de structures constituées de microtubules stables, la polyglutamylatation apparaît également de plus en plus comme un régulateur potentiel de certaines voies de signalisation. Il a en effet été mis en évidence que la longueur des chaînes latérales polyglutamylées sur la tubuline régulaient l'interaction de MAPs et de moteurs moléculaires avec les microtubules (Janke *et al.* 2008). De façon intéressante, une septine (SEPT2) a été retrouvée localisée au niveau de microtubules polyglutamylés dans une étude portant sur le trafic vésiculaire (Spiliotis *et al.* 2008).

La question relative au degré d'accumulation sur les microtubules des cellules résistantes T8 de certaines modifications post-traductionnelles de tubuline s'est alors posée. Les résultats obtenus ont montré que les microtubules des cellules résistantes T8 s'avéraient davantage polyglutamylés que ceux des cellules sensibles Tv (Figure 58). De plus, une diminution de la glutamylation de l'extrémité C-terminale de la tubuline, associée à une augmentation de la tyrosination mais pas de  $\Delta 2$ -tubuline sur les microtubules des cellules résistantes T8 a également été observée. Particulièrement abondante sur les microtubules des cellules nerveuses (Moutin *et al.* 2011), l'accumulation d'un taux anormalement élevé de tubuline polyglutamylée a été décrite dans la neurodégénérescence, en particulier dans le phénotype de souris *pcd*, associé à une perte du gène codant la carboxypeptidase CCP1 nécessaire pour raccourcir les chaînes latérales polyglutamylées (Fernandez-Gonzalez *et al.* 2002; Rogowski *et al.* 2010). Ces études, auxquelles s'ajoutent d'autres études visant à comprendre l'importance des polyglutamylases TTLLs (Ikegami *et al.* 2006; Ikegami *et al.* 2007; Pathak *et al.* 2007), suggèrent la nécessité d'une régulation fine de la polyglutamylation par les enzymes impliquées (polyglutamylases et déglutamylases). Mais, seule une étude révèle une augmentation de la polyglutamylation de la tubuline dans le cancer de la prostate (Soucek *et al.* 2006). Sinon, la surexpression de la polyglutamylase TTLL4, en augmentant la polyglutamylation de la protéine oncogénique d'échafaudage PELP1 et un remodelage consécutif de la chromatine, a été reliée au cancer du pancréas (Kashiwaya *et al.* 2010). Par ailleurs, aucune étude ne lie une augmentation de la tyrosination de la tubuline à un phénotype cancéreux, ce qui, au contraire, est le cas pour la détyrosination qui semble fréquente dans certains cancers du sein de mauvais pronostic (Mialhe *et al.* 2001). En revanche, une accumulation sur les microtubules de la polyglutamylation et de la tyrosination a déjà été associée à des phénotypes chimiorésistants (Sangrajrang *et al.* 1998; Banerjee 2002), bien qu'aucun mécanisme n'ait été proposé.

Etant donné le lien établi entre les septines ou les modifications post-traductionnelles de tubuline et de nombreuses pathologies, dont les maladies neurodégénératives et certains cancers, nous avons ensuite recherché à étudier l'impact de la surexpression et de l'inhibition, à la fois des septines et des enzymes impliquées dans la polyglutamylation et la tyrosination de tubuline, sur la sensibilité/résistance au Taxol des cellules Tv et T8.

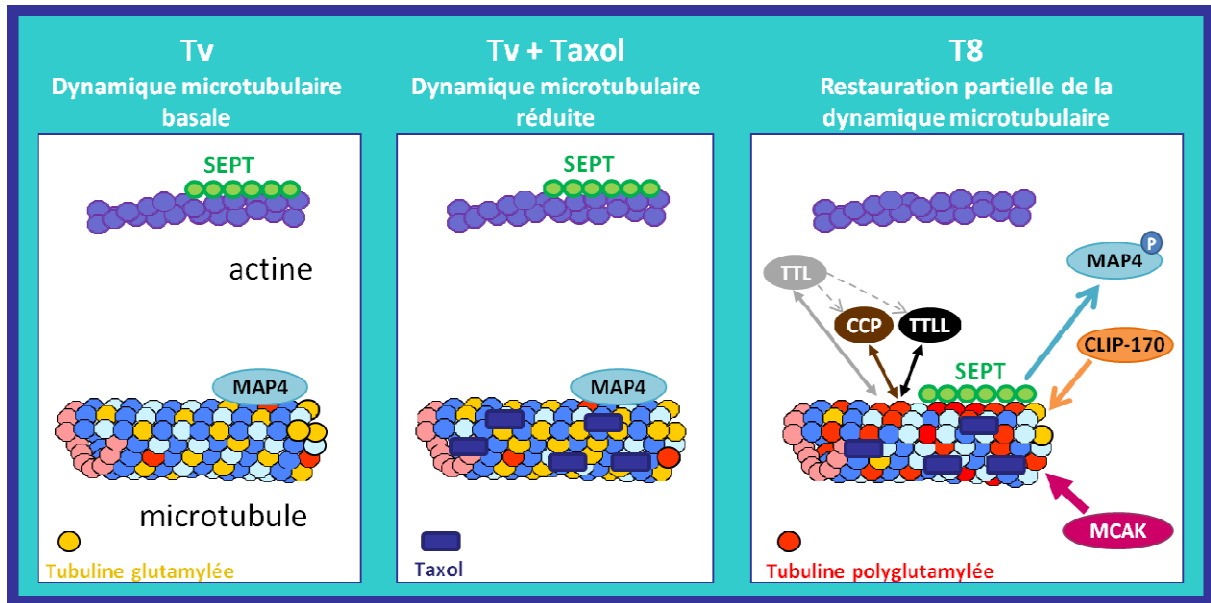
De manière intéressante, la sensibilité au Taxol des cellules résistantes T8 a pu être restaurée de trois manières différentes, soit en inhibant partiellement l'expression des septines (Figure 55), ou de la tubuline tyrosine ligase TTL (Figure 62), soit en surexprimant la déglutamylase débranchante CCP5 (et dans une moindre mesure la déglutamylase CCP1) (Figure 64). Inversement, une résistance partielle au Taxol des cellules sensibles Tv a pu être instaurée en surexprimant les polyglutamylases initiatrice et élongatrice TTLL5 et TTLL11 (Figure 71). De plus, nous avons montré que la modulation de la polyglutamylation, que ce soit par la surexpression de CCP5 (chez les T8) ou des

TLL5 et 11 (chez les Tv), perturbait le recrutement et la localisation des septines dans les cellules résistantes (Figure 65) et sensibles (Figure 73). Ces expériences visant à réduire (chez les cellules résistantes T8) ou à augmenter (chez les cellules sensibles Tv) le niveau de polyglutamylation de la tubuline ou de recrutement des septines sur les microtubules a permis, pour la première fois, d'établir un lien étroit entre modifications post-traductionnelles de tubuline, septines et chimiorésistance.

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, la polyglutamylation, probablement en augmentant le nombre de charges négatives au niveau de l'extrémité C-terminale de tubuline, est capable de moduler le recrutement sur les microtubules de certaines protéines, comme les MAPs ou les moteurs moléculaires. En ce sens, la longueur de la chaîne polyglutamylée joue un rôle prépondérant (Janke *et al.* 2008). Même si la phosphorylation de MAP4 et sa dissociation consécutive des microtubules ont déjà été associées à une résistance au Taxol de cellules cancéreuses ovariennes (Poruchynsky *et al.* 2001), il a également été suggéré que les septines pouvaient empêcher la liaison de cette protéine aux microtubules (Kremer *et al.* 2005). C'est également ce que nous observons, à savoir une diminution de son recrutement dans la fraction microtubulaire des cellules résistantes T8 (Figure 75). La longueur des chaînes polyglutamylées, en favorisant le recrutement des septines, au détriment de MAP4, régulerait la liaison de cette dernière aux microtubules, permettant ainsi de restaurer une certaine dynamique microtubulaire.

Outre la polyglutamylation, il a également été montré que la tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline affectait le recrutement de certaines protéines associées au bout (+) du microtubule, permettant d'accroître la dynamique microtubulaire. C'est le cas du facteur de sauvetage CLIP-170 et de la kinésine dépolymérisante MCAK, qui sont deux protéines décrites comme étant davantage recrutées sur les microtubules tyrosinés (Peris *et al.* 2006). De plus, une étude très récente a montré que MCAK augmentait la fréquence de détachement des microtubules du centromère et, par conséquent, même si c'est un mécanisme opérant au bout (-) du microtubule, une contribution de cette kinésine dépolymérisante à l'acquisition d'une résistance au Taxol (Ganguly *et al.* 2011b). La diminution du recrutement sur les microtubules de MAP4 associée au recrutement accru de deux +TIPs, CLIP-170 et MCAK, dans les cellules résistantes T8, pourrait favoriser une certaine restauration de la dynamique microtubulaire, et ainsi être un des moyens mis en place par ces cellules T8 pour résister au Taxol. Les mesures des vitesses de polymérisation des microtubules n'ont certes pas montré de différence significative, hormis l'effet stabilisateur du Taxol, entre les cellules Tv et T8 (Figure 74), mais la mesure des autres paramètres de la dynamique microtubulaire, tels que les fréquences de sauvetages et de catastrophes, est indispensable pour confirmer l'hypothèse d'une restauration de dynamique microtubulaire.

Au vu des résultats obtenus au cours de ce travail, un mécanisme hypothétique de résistance au Taxol dans les cellules MDA-MB 231 a été élaboré, impliquant les septines, ainsi que la polyglutamylation et la tyrosination de la tubuline (Figure 79).



**Figure 79 : Mécanisme hypothétique de résistance au Taxol des cellules MDA-MB 231 impliquant les septines et la polyglutamylation/tyrosination de la tubuline pour une restauration partielle de la dynamique microtubulaire**

Dans les cellules sensibles Tv, les filaments de septines sont associés aux fibres d'actine. Quant aux microtubules, ils sont peu polyglutamylés et les chaînes latérales de glutamate qui peuvent être présentes sur la tubuline sont courtes. Le niveau de fonctionnement du cycle de tyrosination/détyrosination fait que les microtubules de ces cellules sont plutôt détyrosinés, la tubuline exposant un glutamate à son extrémité C-terminale (tubuline glutamylée). Dans ces conditions, les microtubules recrutent de façon équilibrée, des protéines impliquées aussi bien dans leur stabilisation (comme MAP4) que dans leur dépolymérisation, leur conférant ainsi une dynamique microtubulaire basale.

Lorsque les cellules sensibles Tv sont ponctuellement traitées par 25nM de Taxol pendant 24h, c'est-à-dire à la concentration de culture des cellules résistantes T8, les septines restent associées aux fibres d'actine. Les microtubules, stabilisés par le Taxol, présentent une dynamique microtubulaire réduite. Une accumulation de tubuline glutamylée, marqueur de microtubules stables (Kreis 1987), est observée sans toutefois être associée à une plus forte quantité de tubuline polyglutamylée.

En revanche, les cellules résistantes T8, cultivées en permanence en présence de 25nM de Taxol, ont mis en place un ou des mécanismes d'adaptation afin de compenser l'effet stabilisateur de cette

molécule. La surexpression et l'incorporation dans les microtubules des isotypes III et IV de  $\beta$ -tubuline réduiraient l'affinité du Taxol pour la tubuline, contribuant ainsi en partie au phénotype chimiorésistant. Déjà décrite dans différents modèles d'étude, cette surexpression de  $\beta$ III- et  $\beta$ IV-tubuline correspondrait plutôt à un mécanisme rapide d'adaptation au Taxol.

Puis un mécanisme plus complexe se serait alors mis en place au cours de l'acquisition progressive de la résistance des cellules MDA-MB 231. D'après nos résultats expérimentaux, une augmentation de la tyrosination de l' $\alpha$ -tubuline due à une surexpression ou à une activation de la tubuline tyrosine ligase (dont l'expression génique est augmentée chez les T8) serait à l'origine de la mise en place de ce mécanisme d'adaptation. Puis il s'ensuirait une augmentation de la polyglutamylation de la tubuline, sous l'action finement régulée de polyglutamylases et de déglutamylases. En effet, nous avons montré que la tyrosination influait sur la polyglutamylation, l'inhibition de la première empêchant la formation ou favorisant le raccourcissement des longues chaînes latérales de glutamate à l'extrémité C-terminale de tubuline. Parallèlement à l'augmentation d'expression du gène *TTL* dans les cellules résistantes, nos expériences de PCR quantitative ont également mis en évidence une surexpression génique des gènes *TLL1* et *CCP1* codant des enzymes impliquées dans la régulation du niveau de polyglutamylation de la tubuline. Le rôle controversé de la déglutamylase CCP1, qui pourrait également catalyser des réactions de détyrosination (Rogowski *et al.* 2010; Wloga and Gaertig 2010), pourrait correspondre à un premier lien entre tyrosination et polyglutamylation.

La génération de longues chaînes polyglutamylées, qui ne doivent être ni trop courtes ni trop longues, induirait alors le recrutement sur les microtubules des filaments de septines. En ce sens, nos résultats corroborent ceux de Spiliotis *et al.* (2008) qui a mis en évidence la localisation subcellulaire de SEPT2 sur cet élément de cytosquelette dans le transport vésiculaire. Néanmoins, cette relocalisation des septines sur les microtubules des cellules T8 aurait été facilitée par la surexpression concomitante de l'isoforme SEPT9\_v1, qui a déjà été impliqué dans la localisation subcellulaire des septines sur les microtubules (Gonzalez *et al.* 2007). Par ailleurs, la surexpression des polyglutamylases initiateur et élongatrice TLL5 et TLL11 dans les cellules sensibles Tv n'induisant pas, à elles seules, un recrutement des septines sur les microtubules, qui se réarrangent juste en anneaux, suggère qu'une protéine adaptatrice (comme l'anilline associée à l'actine (Kinoshita *et al.* 2002)) doit être nécessaire pour permettre le recrutement des septines sur les microtubules. La protéine Flee (ou un analogue), fortement exprimée dans les cellules ciliées et régulant indirectement la polyglutamylation de la tubuline en se comportant comme une protéine adaptatrice, facilitant l'accès ou le transport des TLLs à destination du cil chez le poisson-zèbre (Pathak and Drummond 2009), pourrait jouer ce rôle.

Puis, la forte tyrosination et polyglutamylation de la tubuline ainsi que l'association des septines avec les polymères de tubuline, en perturbant le recrutement sur les microtubules de plusieurs protéines

impliquées dans la régulation fine de la dynamique microtubulaire, permettraient donc aux cellules MDA-MB 231 T8 de pouvoir résister à une concentration élevée de Taxol. Ainsi, les filaments de septine localisés sur les microtubules empêcheraient la liaison de la protéine stabilisatrice MAP4 à la tubuline polymérisée. Des données suggérant une interaction directe entre la forme libre de MAP4 et les septines indiquent d'ailleurs qu'une des fonctions des septines serait, en empêchant la liaison de MAP4 aux microtubules, de déstabiliser les microtubules (Kremer *et al.* 2005).

Enfin, l'accumulation de tubuline tyrosinée, en recrutant préférentiellement au bout (+) du microtubule le facteur de sauvetage CLIP-170 et la kinésine dépolymérisante MCAK (Peris *et al.* 2006), permettrait d'augmenter les fréquences de sauvetages et/ou de catastrophes des microtubules, favorisant, là encore, la restauration d'une certaine dynamique microtubulaire, et donc l'apparition d'un phénotype chimiorésistant.

Bien évidemment, il ne s'agit que d'un mécanisme hypothétique et des expériences complémentaires sont nécessaires pour permettre sa validation.

A court terme, même si les cellules MDA-MB 231 ne sont pas un modèle facile, surtout lorsqu'elles sont cultivées en présence de Taxol qui induit la formation de « bundles », il est indispensable de tenter de mesurer les autres paramètres de la dynamique microtubulaire, afin de réellement pouvoir parler d'une restauration de dynamique. Il serait également intéressant d'étudier, par exemple, l'impact d'une surexpression conjointe d'une polyglutamylase initiatrice avec celle d'une élongatrice, sur le recrutement des septines et la résistance au Taxol, instaurée seulement partiellement lors de la surexpression de l'une ou de l'autre. De même, la surexpression de plusieurs septines (dont SEPT9\_v1), conjointement, dans les cellules sensibles, serait nécessaire afin de vérifier s'il est possible d'induire leur recrutement sur les microtubules, même si une protéine adaptatrice est certainement nécessaire et reste à trouver.

L'utilisation de forchlorfenuron (FCF), une petite molécule permettant d'altérer l'organisation des septines chez la levure et dans les lignées cellulaires HeLa et MDCK (Iwase *et al.* 2004; Hu *et al.* 2008), utilisée seule ou combinée avec différentes transfections de polyglutamylases ou déglutamylases, devrait permettre d'apporter des renseignements supplémentaires quant à la séquence des évènements décrits dans le modèle.

En ce qui concerne le degré de polyglutamylation des microtubules des cellules sensibles et résistantes, il apparaît nécessaire de poursuivre les expériences de protéomique, afin de déterminer le nombre de résidus glutamate présents sur les chaînes latérales polyglutamylées de nos cellules. L'analyse par 2-DE suivie d'un immunoblot, utilisant à la fois les anticorps reconnaissant les courtes et les longues chaînes latérales polyglutamylées, pourra être complétée si nécessaire par une étude des spectres des ions fragmentés générés par la LC-MS/MS.



A moyen terme, des immunoblots après séparation des protéines sur gel 2D pourront être réalisés après surexpression de certaines enzymes impliquées dans la régulation de la polyglutamylation et tyrosination de la tubuline dans le but de vérifier l'impact réel de ces transfections et donc de déterminer la longueur optimale de la chaîne polyglutamylée pour recruter les septines. L'étude de l'importance de la polyglutamylation dans ce phénomène de chimiorésistance pourra également être abordée en micro-injectant les anticorps anti-GT335 (courte chaîne polyglutamylée) ou anti-polyE (longues chaînes), ou en mutant les différents sites de polyglutamylation, ce qui pourrait dans le dernier cas fournir des informations complémentaires quant à la spécificité de la polyglutamylation de l' $\alpha$ - ou de la  $\beta$ -tubuline.

A plus long terme, il serait également intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation afin de déterminer si une interaction entre les septines et les polyglutamylases existe, qui permettrait d'expliquer la diminution du niveau d'accumulation de tubuline polyglutamylée à longues chaînes dans les fractions microtubulaires des cellules T8 suite à l'inhibition partielle de l'expression des septines (Figure 66). Une des explications pourrait, par exemple, être que les TTLLs, pour être fonctionnelles dans les cellules T8, doivent être localisées sur les filaments de septines.

La recherche de la protéine adaptatrice permettant de recruter les septines sur les microtubules pourrait également être un axe de recherche intéressant et pourrait commencer par l'étude de l'expression d'un analogue de Fleer dans les cellules sensibles et résistantes.

Enfin, pour valider complètement notre modèle, il serait important de comprendre comment la tyrosination peut influencer la longueur des chaînes latérales de glutamate à l'extrémité C-terminale de la tubuline. S'agit-il d'un problème de conformation du microtubule qui, lorsqu'il contient une large proportion de tubuline tyrosinée favoriserait ou empêcherait l'accessibilité à certaines enzymes impliquées dans la polyglutamylation ? Existe-t-il une enzyme (comme CCP1 ?) ou un complexe enzymatique qui régulerait simultanément l'accumulation sur la tubuline de ces deux modifications post-traductionnelles ?

Ce travail a permis d'établir, sur des cellules épithéliales de cancer mammaire (la lignée MDA-MB 231), les bases d'un nouveau mécanisme de résistance au Taxol impliquant les septines, et a mis en évidence un lien de causalité avec la polyglutamylation et la tyrosination de la tubuline. La recherche de ces modulations clés devra néanmoins être réalisée sur des cancers mammaires sensibles et résistants au Taxol, issus de biopsies de patients. Alors, il sera enfin possible de déterminer si les septines, la polyglutamylation et la tyrosination de la tubuline ont une véritable importance fonctionnelle dans la résistance au Taxol de cancers du sein.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams, R. R., A. A. Tavares, A. Salzberg, H. J. Bellen and D. M. Glover (1998). *pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis*. *Genes Dev* **12**(10): 1483-94.
- Adeyinka, A., Y. Nui, T. Cherlet, L. Snell, P. H. Watson and L. C. Murphy (2002). *Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression*. *Clin Cancer Res* **8**(6): 1747-53.
- Aizawa, H., Y. Emori, A. Mori, H. Murofushi, H. Sakai and K. Suzuki (1991). *Functional analyses of the domain structure of microtubule-associated protein-4 (MAP-U)*. *J Biol Chem* **266**(15): 9841-6.
- Akella, J. S., D. Wloga, J. Kim, N. G. Starostina, S. Lyons-Abbott, N. S. Morrissette, S. T. Dougan, E. T. Kipreos and J. Gaertig (2010). *MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase*. *Nature* **467**(7312): 218-22.
- Akhmanova, A. and C. C. Hoogenraad (2005). *Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions*. *Curr Opin Cell Biol* **17**(1): 47-54.
- Alberts, B. J., A. Lewis, J. et al. (2002). *The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments*. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science.
- Alexander, J. E., D. F. Hunt, M. K. Lee, J. Shabanowitz, H. Michel, S. C. Berlin, T. L. MacDonald, R. J. Sundberg, L. I. Rebhun and A. Frankfurter (1991). *Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4685-9.
- Allan, V. (2000). *Dynactin*. *Curr Biol* **10**(12): R432.
- Allan, V. J., H. M. Thompson and M. A. McNiven (2002). *Motoring around the Golgi*. *Nat Cell Biol* **4**(10): E236-42.
- Alli, E., J. Bash-Babula, J. M. Yang and W. N. Hait (2002). *Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer*. *Cancer Res* **62**(23): 6864-9.
- Alvarez, M., K. Paull, A. Monks, C. Hose, J. S. Lee, J. Weinstein, M. Grever, S. Bates and T. Fojo (1995). *Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen*. *J Clin Invest* **95**(5): 2205-14.
- Amir, S. and N. J. Mabweesh (2007). *SEPT9\_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule-disrupting agents*. *Cancer Biol Ther* **6**(12): 1926-31.
- Amir, S., R. Wang, H. Matzkin, J. W. Simons and N. J. Mabweesh (2006). *MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis*. *Cancer Res* **66**(2): 856-66.
- Andre, F., C. Hatzis, K. Anderson, C. Sotiriou, C. Mazouni, J. Mejia, B. Wang, G. N. Hortobagyi, W. F. Symmans and L. Pusztai (2007). *Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer*. *Clin Cancer Res* **13**(7): 2061-7.
- Audebert, S., E. Desbruyeres, C. Gruszczynski, A. Koulakoff, F. Gros, P. Denoulet and B. Edde (1993). *Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons*. *Mol Biol Cell* **4**(6): 615-26.
- Baas, P. W. and D. W. Buster (2004). *Slow axonal transport and the genesis of neuronal morphology*. *J Neurobiol* **58**(1): 3-17.
- Banerjee, A. (2002). *Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 598-601.
- Banerjee, A. and L. T. Kasmala (1998). *Differential assembly kinetics of alpha-tubulin isoforms in the presence of paclitaxel*. *Biochem Biophys Res Commun* **245**(2): 349-51.
- Barral, Y., V. Mermall, M. S. Mooseker and M. Snyder (2000). *Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast*. *Mol Cell* **5**(5): 841-51.
- Bartek, J., R. Iggo, J. Gannon and D. P. Lane (1990). *Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines*. *Oncogene* **5**(6): 893-9.

- Bauer, J. A., A. B. Chakravarthy, J. M. Rosenbluth, D. Mi, E. H. Seeley, N. De Matos Granja-Ingram, M. G. Olivares, M. C. Kelley, I. A. Mayer, I. M. Meszoely, J. A. Means-Powell, K. N. Johnson, C. J. Tsai, G. D. Ayers, M. E. Sanders, R. J. Schneider, S. C. Formenti, R. M. Caprioli and J. A. Pietenpol (2010). *Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation*. Clin Cancer Res **16**(2): 681-90.
- Beites, C. L., K. A. Campbell and W. S. Trimble (2005). *The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex*. Biochem J **385**(Pt 2): 347-53.
- Beites, C. L., H. Xie, R. Bowser and W. S. Trimble (1999). *The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis*. Nat Neurosci **2**(5): 434-9.
- Belmont, L., T. Mitchison and H. W. Deacon (1996). *Catastrophic revelations about Op18/stathmin*. Trends Biochem Sci **21**(6): 197-8.
- Belmont, L. D., A. A. Hyman, K. E. Sawin and T. J. Mitchison (1990). *Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts*. Cell **62**(3): 579-89.
- Bennett, K. L., M. Karpenko, M. T. Lin, R. Claus, K. Arab, G. Dyckhoff, P. Plinkert, E. Herpel, D. Smiraglia and C. Plass (2008). *Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res **68**(12): 4494-9.
- Bennett, K. L., W. Lee, E. Lamarre, X. Zhang, R. Seth, J. Scharpf, J. Hunt and C. Eng (2010). *HPV status-independent association of alcohol and tobacco exposure or prior radiation therapy with promoter methylation of FUSSEL18, EBF3, IRX1, and SEPT9, but not SLC5A8, in head and neck squamous cell carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer **49**(4): 319-26.
- Bennouna, J., J. L. Breton, J. M. Tourani, C. Ottensmeier, M. O'Brien, P. Kosmidis, T. E. Huat, M. C. Pinel, C. Colin and J. Y. Douillard (2006). *Vinflunine -- an active chemotherapy for treatment of advanced non-small-cell lung cancer previously treated with a platinum-based regimen: results of a phase II study*. Br J Cancer **94**(10): 1383-8.
- Bergstralh, D. T. and J. P. Ting (2006). *Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination*. Cancer Treat Rev **32**(3): 166-79.
- Berlin, A., A. Paoletti and F. Chang (2003). *Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast*. J Cell Biol **160**(7): 1083-92.
- Berrieman, H. K., M. J. Lind and L. Cawkwell (2004). *Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy?* Lancet Oncol **5**(3): 158-64.
- Bertin, A., M. A. McMurray, P. Grob, S. S. Park, G. Garcia, 3rd, I. Patanwala, H. L. Ng, T. Alber, J. Thorner and E. Nogales (2008). *Saccharomyces cerevisiae septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8274-9.
- Bharadwaj, R. and H. Yu (2004). *The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer*. Oncogene **23**(11): 2016-27.
- Bhat, K. M. and V. Setaluri (2007). *Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy*. Clin Cancer Res **13**(10): 2849-54.
- Bhattacharya, R. and F. Cabral (2004). *A ubiquitous beta-tubulin disrupts microtubule assembly and inhibits cell proliferation*. Mol Biol Cell **15**(7): 3123-31.
- Bhattacharyya, B. and J. Wolff (1974). *Promotion of fluorescence upon binding of colchicine to tubulin*. Proc Natl Acad Sci U S A **71**(7): 2627-31.
- Bi, E., P. Maddox, D. J. Lew, E. D. Salmon, J. N. McMillan, E. Yeh and J. R. Pringle (1998). *Involvement of an actomyosin contractile ring in Saccharomyces cerevisiae cytokinesis*. J Cell Biol **142**(5): 1301-12.
- Bieche, I., S. Lachkar, V. Becette, C. Cifuentes-Diaz, A. Sobel, R. Lidereau and P. A. Curmi (1998). *Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer*. Br J Cancer **78**(6): 701-9.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier and W. Postel (1982). *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods **6**(4): 317-39.
- Blagosklonny, M. V. and T. Fojo (1999). *Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review)*. Int J Cancer **83**(2): 151-6.

- Bobinac, Y., M. Moudjou, J. P. Fouquet, E. Desbruyeres, B. Edde and M. Bornens (1998). *Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells*. Cell Motil Cytoskeleton **39**(3): 223-32.
- Bombonati, A. and D. C. Sgroi (2011). *The molecular pathology of breast cancer progression*. J Pathol **223**(2): 308-18.
- Bonnet, C., D. Boucher, S. Lazereg, B. Pedrotti, K. Islam, P. Denoulet and J. C. Larcher (2001). *Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation*. J Biol Chem **276**(16): 12839-48.
- Bonnet, C., E. Denarier, C. Bosc, S. Lazereg, P. Denoulet and J. C. Larcher (2002). *Interaction of STOP with neuronal tubulin is independent of polyglutamylation*. Biochem Biophys Res Commun **297**(4): 787-93.
- Borkhardt, A., A. Teigler-Schlegel, U. Fuchs, C. Keller, M. König, J. Harbott and O. A. Haas (2001). *An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2*. Genes Chromosomes Cancer **32**(1): 82-8.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst **92**(16): 1295-302.
- Boucher, D., J. C. Larcher, F. Gros and P. Denoulet (1994). *Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin*. Biochemistry **33**(41): 12471-7.
- Bowen, J. R., D. Hwang, X. Bai, D. Roy and E. T. Spiliotis (2011). *Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia*. J Cell Biol **194**(2): 187-97.
- Braakhuis, B. J., B. T. Hill, M. Dietel, L. R. Kelland, M. S. Aapro, W. Zoli and P. Lelieveld (1994). *In vitro antiproliferative activity of docetaxel (Taxotere), paclitaxel (Taxol) and cisplatin against human tumour and normal bone marrow cells*. Anticancer Res **14**(1A): 205-8.
- Braguer, D., J. M. Barret, H. McDaid and A. Kruczynski (2008). *Antitumor activity of vinflunine: effector pathways and potential for synergies*. Semin Oncol **35**(3 Suppl 3): S13-21.
- Breuninger, L. M., S. Paul, K. Gaughan, T. Miki, A. Chan, S. A. Aaronson and G. D. Kruh (1995). *Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution*. Cancer Res **55**(22): 5342-7.
- Brinkley, B. R., P. T. Beall, L. J. Wible, M. L. Mace, D. S. Turner and R. M. Cailleau (1980). *Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro*. Cancer Res **40**(9): 3118-29.
- Brinkley, B. R. and J. Cartwright, Jr. (1975). *Cold-labile and cold-stable microtubules in the mitotic spindle of mammalian cells*. Ann N Y Acad Sci **253**: 428-39.
- Brito, D. A., Z. Yang and C. L. Rieder (2008). *Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied*. J Cell Biol **182**(4): 623-9.
- Brown, K. J. and C. Fenselau (2004). *Investigation of doxorubicin resistance in MCF-7 breast cancer cells using shot-gun comparative proteomics with proteolytic 18O labeling*. J Proteome Res **3**(3): 455-62.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof (2000). *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.
- Buey, R. M., E. Calvo, I. Barasoain, O. Pineda, M. C. Edler, R. Matesanz, G. Cerezo, C. D. Vanderwal, B. W. Day, E. J. Sorensen, J. A. Lopez, J. M. Andreu, E. Hamel and J. F. Diaz (2007). *Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites*. Nat Chem Biol **3**(2): 117-25.
- Bulinski, J. C. and G. G. Borisy (1980a). *Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. Analysis of molecular properties and effects on microtubule polymerization*. J Biol Chem **255**(23): 11570-6.
- Bulinski, J. C. and G. G. Borisy (1980b). *Widespread distribution of a 210,000 mol wt microtubule-associated protein in cells and tissues of primates*. J Cell Biol **87**(3 Pt 1): 802-8.

- Bunker, J. M., L. Wilson, M. A. Jordan and S. C. Feinstein (2004). *Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration*. *Mol Biol Cell* **15**(6): 2720-8.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, T. Nilsson and R. B. Vallee (1997). *Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution*. *J Cell Biol* **139**(2): 469-84.
- Burkhart, C. A., M. Kavallaris and S. Band Horwitz (2001). *The role of beta-tubulin isoforms in resistance to antimetabolic drugs*. *Biochim Biophys Acta* **1471**(2): O1-9.
- Burns, R. G. (1991). *Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints*. *Cell Motil Cytoskeleton* **20**(3): 181-9.
- Burrows, J. F., S. Chanduloy, M. A. McIlhatton, H. Nagar, K. Yeates, P. Donaghy, J. Price, A. K. Godwin, P. G. Johnston and S. E. Russell (2003). *Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia*. *J Pathol* **201**(4): 581-8.
- Byers, B. and L. Goetsch (1976). *A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast*. *J Cell Biol* **69**(3): 717-21.
- Cabral, F. R., R. C. Brady and M. J. Schibler (1986). *A mechanism of cellular resistance to drugs that interfere with microtubule assembly*. *Ann N Y Acad Sci* **466**: 745-56.
- Calligaris, D., P. Verdier-Pinard, F. Devred, C. Villard, D. Braguer and D. Lafitte (2010). *Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics*. *Cell Mol Life Sci* **67**(7): 1089-104.
- Cao, L., X. Ding, W. Yu, X. Yang, S. Shen and L. Yu (2007). *Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan*. *FEBS Lett* **581**(28): 5526-32.
- Cao, L., W. Yu, Y. Wu and L. Yu (2009). *The evolution, complex structures and function of septin proteins*. *Cell Mol Life Sci* **66**(20): 3309-23.
- Cardone, L., T. de Cristofaro, A. Affaitati, C. Garbi, M. D. Ginsberg, M. Saviano, S. Varrone, C. S. Rubin, M. E. Gottesman, E. V. Avvedimento and A. Feliciello (2002). *A-kinase anchor protein 84/121 are targeted to mitochondria and mitotic spindles by overlapping amino-terminal motifs*. *J Mol Biol* **320**(3): 663-75.
- Caron, J. M. (1997). *Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies*. *Mol Biol Cell* **8**(4): 621-36.
- Casamayor, A. and M. Snyder (2003). *Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function*. *Mol Cell Biol* **23**(8): 2762-77.
- Cassimeris, L. (2002). *The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers*. *Curr Opin Cell Biol* **14**(1): 18-24.
- Cassimeris, L. and J. Morabito (2004). *TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization, and bipolar spindle assembly*. *Mol Biol Cell* **15**(4): 1580-90.
- Cassimeris, L. U., P. Wadsworth and E. D. Salmon (1986). *Dynamics of microtubule depolymerization in monocytes*. *J Cell Biol* **102**(6): 2023-32.
- Cerveira, N., C. Correia, S. Bizarro, C. Pinto, S. Lisboa, J. M. Mariz, M. Marques and M. R. Teixeira (2006). *SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23)*. *Oncogene* **25**(45): 6147-52.
- Cha, B. J., B. Error and D. L. Gard (1998). *XMAP230 is required for the assembly and organization of acetylated microtubules and spindles in Xenopus oocytes and eggs*. *J Cell Sci* **111** ( Pt 16): 2315-27.
- Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand and C. Pous (2001). *The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle*. *Mol Biol Cell* **12**(7): 2047-60.
- Chakrabarti, L., J. Eng, R. A. Martinez, S. Jackson, J. Huang, D. E. Possin, B. L. Sopher and A. R. La Spada (2008). *The zinc-binding domain of Nnal is required to prevent retinal photoreceptor loss and cerebellar ataxia in Purkinje cell degeneration (pcd) mice*. *Vision Res* **48**(19): 1999-2005.
- Chang, F. (2000). *Microtubule and actin-dependent movement of the formin cdc12p in fission yeast*. *Microsc Res Tech* **49**(2): 161-7.
- Chang, F., D. Drubin and P. Nurse (1997). *cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin*. *J Cell Biol* **137**(1): 169-82.

- Chang, P. and T. Stearns (2000). *Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function*. *Nat Cell Biol* **2**(1): 30-5.
- Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan and N. Hirokawa (1992). *Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons*. *Nature* **360**(6405): 674-7.
- Chi, K. N., S. K. Chia, R. Dixon, M. J. Newman, V. J. Wachter, B. Sikic and K. A. Gelmon (2005). *A phase I pharmacokinetic study of the P-glycoprotein inhibitor, ONT-093, in combination with paclitaxel in patients with advanced cancer*. *Invest New Drugs* **23**(4): 311-5.
- Chretien, D., S. D. Fuller and E. Karsenti (1995). *Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates*. *J Cell Biol* **129**(5): 1311-28.
- Chung, E. and R. H. Chen (2003). *Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint*. *Nat Cell Biol* **5**(8): 748-53.
- Chuthapisith, S., R. Layfield, I. D. Kerr, C. Hughes and O. Eremin (2007). *Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs*. *Int J Oncol* **30**(6): 1545-51.
- Cicchillitti, L., M. Di Michele, A. Urbani, C. Ferlini, M. B. Donat, G. Scambia and D. Rotilio (2009). *Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A2780 epithelial ovarian cancer cell line and its resistant counterpart A2780TC1 by 2D-DIGE: the role of ERp57*. *J Proteome Res* **8**(4): 1902-12.
- Cole, N. B. and J. Lippincott-Schwartz (1995). *Organization of organelles and membrane traffic by microtubules*. *Curr Opin Cell Biol* **7**(1): 55-64.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line*. *Science* **258**(5088): 1650-4.
- Cole, S. P., K. E. Sparks, K. Fraser, D. W. Loe, C. E. Grant, G. M. Wilson and R. G. Deeley (1994). *Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells*. *Cancer Res* **54**(22): 5902-10.
- Conacci-Sorrell, M., C. Ngouenet and R. N. Eisenman (2010). *Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation*. *Cell* **142**(3): 480-93.
- Connolly, D., I. Abdesselam, P. Verdier-Pinard and C. Montagna (2011a). *Septin roles in tumorigenesis*. *Biol Chem* **392**(8-9): 725-38.
- Connolly, D., Z. Yang, M. Castaldi, N. Simmons, M. H. Oktay, S. Coniglio, M. J. Fazzari, P. Verdier-Pinard and C. Montagna (2011b). *Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression*. *Breast Cancer Res* **13**(4): R76.
- Cooper, G. (2000). *The Cell, a molecular approach*.
- Cooper, J. A. (1987). *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. *J Cell Biol* **105**(4): 1473-8.
- Cooper, J. R. and L. Wordeman (2009). *The diffusive interaction of microtubule binding proteins*. *Curr Opin Cell Biol* **21**(1): 68-73.
- Corral, J., I. Lavenir, H. Impey, A. J. Warren, A. Forster, T. A. Larson, S. Bell, A. N. McKenzie, G. King and T. H. Rabbitts (1996). *An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes*. *Cell* **85**(6): 853-61.
- Cossart, P., J. Pizarro-Cerda and M. Lecuit (2003). *Invasion of mammalian cells by Listeria monocytogenes: functional mimicry to subvert cellular functions*. *Trends Cell Biol* **13**(1): 23-31.
- Courtois, S., G. Verhaegh, S. North, M. G. Luciani, P. Lassus, U. Hibner, M. Oren and P. Hainaut (2002). *DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53*. *Oncogene* **21**(44): 6722-8.
- Coy, D. L., M. Wagenbach and J. Howard (1999). *Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes*. *J Biol Chem* **274**(6): 3667-71.
- Craven, R. A., A. J. Stanley, S. Hanrahan, J. Dods, R. Unwin, N. Totty, P. Harnden, I. Eardley, P. J. Selby and R. E. Banks (2006). *Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma*. *Proteomics* **6**(9): 2853-64.
- Creppe, C., L. Malinouskaya, M. L. Volvert, M. Gillard, P. Close, O. Malaise, S. Laguesse, I. Cornez, S. Rahmouni, S. Ormenese, S. Belachew, B. Malgrange, J. P. Chapelle, U. Siebenlist, G.

- Moonen, A. Chariot and L. Nguyen (2009). *Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin*. Cell **136**(3): 551-64.
- Curmi, P. A., O. Gavet, E. Charbaut, S. Ozon, S. Lachkar-Colmerauer, V. Manceau, S. Siavoshian, A. Maucuer and A. Sobel (1999). *Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin*. Cell Struct Funct **24**(5): 345-57.
- D'Agostino, G., J. del Campo, B. Mellado, M. A. Izquierdo, T. Minarik, L. Cirri, L. Marini, J. L. Perez-Gracia and G. Scambia (2006). *A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer **16**(1): 71-6.
- Daire, V., J. Giustiniani, I. Leroy-Gori, M. Quesnoit, S. Drevensek, A. Dimitrov, F. Perez and C. Pous (2009). *Kinesin-1 regulates microtubule dynamics via a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism*. J Biol Chem **284**(46): 31992-2001.
- Davey, R. and M. Davey (1998). *The extended-MDR phenotype*. Cytotechnology **27**(1-3): 237-47.
- De, S., R. Cipriano, M. W. Jackson and G. R. Stark (2009). *Overexpression of kinesins mediates docetaxel resistance in breast cancer cells*. Cancer Res **69**(20): 8035-42.
- Debernardis, D., E. G. Sire, P. De Feudis, F. Vikhanskaya, M. Valenti, P. Russo, S. Parodi, M. D'Incalci and M. Brogginini (1997). *p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel*. Cancer Res **57**(5): 870-4.
- Dehmelt, L. and S. Halpain (2004). *Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link?* J Neurobiol **58**(1): 18-33.
- Dehmelt, L. and S. Halpain (2005). *The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins*. Genome Biol **6**(1): 204.
- DeMay, B. S., R. A. Meseroll, P. Occhipinti and A. S. Gladfelter (2010). *Cellular requirements for the small molecule forchlorfenuron to stabilize the septin cytoskeleton*. Cytoskeleton (Hoboken) **67**(6): 383-99.
- den Hollander, P. and R. Kumar (2006). *Dynein light chain 1 contributes to cell cycle progression by increasing cyclin-dependent kinase 2 activity in estrogen-stimulated cells*. Cancer Res **66**(11): 5941-9.
- Derry, W. B., L. Wilson, I. A. Khan, R. F. Luduena and M. A. Jordan (1997). *Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes*. Biochemistry **36**(12): 3554-62.
- Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 83-117.
- deVos, T., R. Tetzner, F. Model, G. Weiss, M. Schuster, J. Distler, K. V. Steiger, R. Grutzmann, C. Pilarsky, J. K. Habermann, P. R. Fleshner, B. M. Oubre, R. Day, A. Z. Sledziewski and C. Lofton-Day (2009). *Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer*. Clin Chem **55**(7): 1337-46.
- Di Michele, M., A. Della Corte, L. Cicchillitti, P. Del Boccio, A. Urbani, C. Ferlini, G. Scambia, M. B. Donati and D. Rotilio (2009). *A proteomic approach to paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer cell lines*. Biochim Biophys Acta **1794**(2): 225-36.
- Diaz, J. F., I. Barasoain and J. M. Andreu (2003). *Fast kinetics of Taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins*. J Biol Chem **278**(10): 8407-19.
- Diaz, J. F., J. M. Valpuesta, P. Chacon, G. Diakun and J. M. Andreu (1998). *Changes in microtubule protofilament number induced by Taxol binding to an easily accessible site. Internal microtubule dynamics*. J Biol Chem **273**(50): 33803-10.
- Dictenberg, J. B., W. Zimmerman, C. A. Sparks, A. Young, C. Vidair, Y. Zheng, W. Carrington, F. S. Fay and S. J. Doxsey (1998). *Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome*. J Cell Biol **141**(1): 163-74.
- Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Pous and F. Perez (2008). *Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues*. Science **322**(5906): 1353-6.
- Dobbelaere, J. and Y. Barral (2004). *Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex*. Science **305**(5682): 393-6.

- Dohi, T., E. Beltrami, N. R. Wall, J. Plescia and D. C. Altieri (2004). *Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis*. J Clin Invest **114**(8): 1117-27.
- Dompierre, J. P., J. D. Godin, B. C. Charrin, F. P. Cordelieres, S. J. King, S. Humbert and F. Saudou (2007). *Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation*. J Neurosci **27**(13): 3571-83.
- Dossou, S. J., M. H. Bre and R. Hallworth (2007). *Mammalian cilia function is independent of the polymeric state of tubulin glycylation*. Cell Motil Cytoskeleton **64**(11): 847-55.
- Drewes, G., A. Ebneith and E. M. Mandelkow (1998). *MAPs, MARKs and microtubule dynamics*. Trends Biochem Sci **23**(8): 307-11.
- Drewes, G., A. Ebneith, U. Preuss, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1997). *MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption*. Cell **89**(2): 297-308.
- Dumontet, C. and M. A. Jordan (2010). *Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics*. Nat Rev Drug Discov **9**(10): 790-803.
- Dumontet, C. and B. I. Sikic (1999). *Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death*. J Clin Oncol **17**(3): 1061-70.
- Dutcher, S. K. (2001). *The tubulin fraternity: alpha to eta*. Curr Opin Cell Biol **13**(1): 49-54.
- Eastman, A. (2004). *Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies*. J Cell Biochem **91**(2): 223-31.
- Edde, B., J. Rossier, J. P. Le Caer, E. Desbruyeres, F. Gros and P. Denoulet (1990). *Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin*. Science **247**(4938): 83-5.
- Edde, B., J. Rossier, J. P. Le Caer, J. C. Prome, E. Desbruyeres, F. Gros and P. Denoulet (1992). *Polyglutamylated alpha-tubulin can enter the tyrosination/detyrosination cycle*. Biochemistry **31**(2): 403-10.
- Eiserich, J. P., A. G. Estevez, T. V. Bamberg, Y. Z. Ye, P. H. Chumley, J. S. Beckman and B. A. Freeman (1999). *Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury*. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6365-70.
- Erck, C., L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A. D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P. A. Salin, D. Job and J. Wehland (2005). *A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization*. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7853-8.
- Eriksson, J. E., T. Dechat, B. Grin, B. Helfand, M. Mendez, H. M. Pallari and R. D. Goldman (2009). *Introducing intermediate filaments: from discovery to disease*. J Clin Invest **119**(7): 1763-71.
- Ernst, P., J. Wang and S. J. Korsmeyer (2002). *The role of MLL in hematopoiesis and leukemia*. Curr Opin Hematol **9**(4): 282-7.
- Ersfeld, K., J. Wehland, U. Plessmann, H. Dodemont, V. Gerke and K. Weber (1993). *Characterization of the tubulin-tyrosine ligase*. J Cell Biol **120**(3): 725-32.
- Estey, M. P., C. Di Ciano-Oliveira, C. D. Froese, M. T. Bejide and W. S. Trimble (2010). *Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission*. J Cell Biol **191**(4): 741-9.
- Estey, M. P., M. S. Kim and W. S. Trimble (2011). *Septins*. Curr Biol **21**(10): R384-7.
- Etienne-Manneville, S. (2004). *Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?* Traffic **5**(7): 470-7.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). *Rho GTPases in cell biology*. Nature **420**(6916): 629-35.
- Faire, K., C. M. Waterman-Storer, D. Gruber, D. Masson, E. D. Salmon and J. C. Bulinski (1999). *E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics*. J Cell Sci **112** ( Pt 23): 4243-55.
- Faller, E. M. and D. L. Brown (2009). *Modulation of microtubule dynamics by the microtubule-associated protein 1a*. J Neurosci Res **87**(5): 1080-9.
- Faller, E. M., T. S. Villeneuve and D. L. Brown (2009). *MAP1a associated light chain 3 increases microtubule stability by suppressing microtubule dynamics*. Mol Cell Neurosci **41**(1): 85-93.
- Fanara, P., B. Oback, K. Ashman, A. Podtelejnikov and R. Brandt (1999). *Identification of MINUS, a small polypeptide that functions as a microtubule nucleation suppressor*. Embo J **18**(3): 565-77.



- Fernandez-Gonzalez, A., A. R. La Spada, J. Treadaway, J. C. Higdon, B. S. Harris, R. L. Sidman, J. I. Morgan and J. Zuo (2002). *Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, Nna1*. *Science* **295**(5561): 1904-6.
- Field, C., R. Li and K. Oegema (1999). *Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison*. *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 68-80.
- Field, C. M. and D. Kellogg (1999). *Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases?* *Trends Cell Biol* **9**(10): 387-94.
- Finger, F. P., K. R. Kopish and J. G. White (2003). *A role for septins in cellular and axonal migration in C. elegans*. *Dev Biol* **261**(1): 220-34.
- Ford, S. K. and J. R. Pringle (1991). *Cellular morphogenesis in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site*. *Dev Genet* **12**(4): 281-92.
- Fortugno, P., N. R. Wall, A. Giodini, D. S. O'Connor, J. Plescia, K. M. Padgett, S. Tognin, P. C. Marchisio and D. C. Altieri (2002). *Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function*. *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 575-85.
- Fouquet, J. P., B. Edde, M. L. Kann, A. Wolff, E. Desbruyeres and P. Denoulet (1994). *Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis*. *Cell Motil Cytoskeleton* **27**(1): 49-58.
- Fourest-Lieuvin, A., L. Peris, V. Gache, I. Garcia-Saez, C. Juillan-Binard, V. Lantéz and D. Job (2006). *Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1*. *Mol Biol Cell* **17**(3): 1041-50.
- Frazier, J. A., M. L. Wong, M. S. Longtine, J. R. Pringle, M. Mann, T. J. Mitchison and C. Field (1998). *Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function*. *J Cell Biol* **143**(3): 737-49.
- Frischknecht, F. and M. Way (2001). *Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization*. *Trends Cell Biol* **11**(1): 30-38.
- Froidevaux-Klipfel, L., F. Poirier, C. Boursier, R. Crepin, C. Pous, B. Baudin and A. Baillet (2011). *Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231*. *Proteomics* **11**(19): 3877-86.
- Fujishima, K., H. Kiyonari, J. Kurisu, T. Hirano and M. Kengaku (2007). *Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons*. *J Neurochem* **102**(1): 77-92.
- Fukata, Y., T. J. Itoh, T. Kimura, C. Menager, T. Nishimura, T. Shiromizu, H. Watanabe, N. Inagaki, A. Iwamatsu, H. Hotani and K. Kaibuchi (2002). *CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly*. *Nat Cell Biol* **4**(8): 583-91.
- Fukushima, N., D. Furuta, Y. Hidaka, R. Moriyama and T. Tsujiuchi (2009). *Post-translational modifications of tubulin in the nervous system*. *J Neurochem* **109**(3): 683-93.
- Fumoleau, P., B. Coudert, N. Isambert and E. Ferrant (2007). *Novel tubulin-targeting agents: anticancer activity and pharmacologic profile of epothilones and related analogues*. *Ann Oncol* **18 Suppl 5**: v9-15.
- Gache, V., P. Waridel, C. Winter, A. Juhem, M. Schroeder, A. Shevchenko and A. V. Popov (2010). *Xenopus meiotic microtubule-associated interactome*. *PLoS One* **5**(2): e9248.
- Gagnon, C., D. White, J. Cosson, P. Huitorel, B. Edde, E. Desbruyeres, L. Paturle-Lafanechere, L. Multigner, D. Job and C. Cibert (1996). *The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility*. *J Cell Sci* **109** ( Pt 6): 1545-53.
- Gan, P. P., E. Pasquier and M. Kavallaris (2007). *Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer*. *Cancer Res* **67**(19): 9356-63.
- Ganguly, A., H. Yang and F. Cabral (2011a). *Overexpression of mitotic centromere-associated Kinesin stimulates microtubule detachment and confers resistance to Paclitaxel*. *Mol Cancer Ther* **10**(6): 929-37.
- Ganguly, A., H. Yang, M. Pedroza, R. Bhattacharya and F. Cabral (2011b). *Mitotic centromere associated kinesin (MCAK) mediates paclitaxel resistance*. *J Biol Chem*.
- Garnier, C., P. Barbier, R. Gilli, C. Lopez, V. Peyrot and C. Briand (1998). *Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation*. *Biochem Biophys Res Commun* **250**(2): 414-9.

- Garreau de Loubresse, N., F. Ruiz, J. Beisson and C. Klotz (2001). *Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of Paramecium basal bodies*. BMC Cell Biol **2**: 4.
- Gascoigne, K. E. and S. S. Taylor (2008). *Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs*. Cancer Cell **14**(2): 111-22.
- Gascoigne, K. E. and S. S. Taylor (2009). *How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?* J Cell Sci **122**(Pt 15): 2579-85.
- Gatti, M., M. G. Giansanti and S. Bonaccorsi (2000). *Relationships between the central spindle and the contractile ring during cytokinesis in animal cells*. Microsc Res Tech **49**(2): 202-8.
- Geeraert, C., A. Ratier, S. G. Pfisterer, D. Perdiz, I. Cantaloube, A. Rouault, S. Pattingre, T. Proikas-Cezanne, P. Codogno and C. Pous (2010). *Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation*. J Biol Chem **285**(31): 24184-94.
- Gehrmann, M. L., C. Fenselau and Y. Hathout (2004). *Highly altered protein expression profile in the adriamycin resistant MCF-7 cell line*. J Proteome Res **3**(3): 403-9.
- Gelfand, V. I. and A. D. Bershadsky (1991). *Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function*. Annu Rev Cell Biol **7**: 93-116.
- Gennerich, A. and R. D. Vale (2009). *Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps*. Curr Opin Cell Biol **21**(1): 59-67.
- Gerth, K., N. Bedorf, G. Hofle, H. Irschik and H. Reichenbach (1996). *Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from Sorangium cellulosum (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties*. J Antibiot (Tokyo) **49**(6): 560-3.
- Geyer, C. E., J. Forster, D. Lindquist, S. Chan, C. G. Romieu, T. Pienkowski, A. Jagiello-Gruszfeld, J. Crown, A. Chan, B. Kaufman, D. Skarlos, M. Campone, N. Davidson, M. Berger, C. Oliva, S. D. Rubin, S. Stein and D. Cameron (2006). *Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer*. N Engl J Med **355**(26): 2733-43.
- Giannakakou, P., D. L. Sackett, Y. K. Kang, Z. Zhan, J. T. Buters, T. Fojo and M. S. Poruchynsky (1997). *Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization*. J Biol Chem **272**(27): 17118-25.
- Gibbons, I. R. and A. J. Rowe (1965). *Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia*. Science **149**(3682): 424-6.
- Giustiniani, J., S. Couloubaly, A. Baillet, M. L. Pourci, I. Cantaloube, C. Fourniat, J. L. Paul and C. Pous (2009a). *Basal endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation on Ser(1177) occurs in a stable microtubule- and tubulin acetylation-dependent manner*. Exp Cell Res **315**(20): 3509-20.
- Giustiniani, J., V. Daire, I. Cantaloube, G. Durand, C. Pous, D. Perdiz and A. Baillet (2009b). *Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53*. Cell Signal **21**(4): 529-39.
- Gladfelter, A. S., I. Bose, T. R. Zyla, E. S. Bardes and D. J. Lew (2002). *Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p*. J Cell Biol **156**(2): 315-26.
- Gladfelter, A. S., J. R. Pringle and D. J. Lew (2001). *The septin cortex at the yeast mother-bud neck*. Curr Opin Microbiol **4**(6): 681-9.
- Goh, E. L., T. J. Pircher and P. E. Lobie (1998). *Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis*. Endocrinology **139**(10): 4364-72.
- Goldstein, L. S. and A. V. Philp (1999). *The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization*. Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 141-83.
- Goncalves, A., D. Braguer, K. Kamath, L. Martello, C. Briand, S. Horwitz, L. Wilson and M. A. Jordan (2001). *Resistance to Taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11737-42.
- Gonczy, P. and A. A. Hyman (1996). *Cortical domains and the mechanisms of asymmetric cell division*. Trends Cell Biol **6**(10): 382-7.
- Gonzalez, M. E., O. Makarova, E. A. Peterson, L. M. Privette and E. M. Petty (2009). *Up-regulation of SEPT9\_v1 stabilizes c-Jun-N-terminal kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells*. Cell Signal **21**(4): 477-87.

- Gonzalez, M. E., E. A. Peterson, L. M. Privette, J. L. Loffreda-Wren, L. M. Kalikin and E. M. Petty (2007). *High SEPT9\_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes*. *Cancer Res* **67**(18): 8554-64.
- Gonzalez-Garay, M. L., L. Chang, K. Blade, D. R. Menick and F. Cabral (1999). *A beta-tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance*. *J Biol Chem* **274**(34): 23875-82.
- Goode, B. L., D. G. Drubin and G. Barnes (2000). *Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons*. *Curr Opin Cell Biol* **12**(1): 63-71.
- Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber and W. Weiss (2000). *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. *Electrophoresis* **21**(6): 1037-53.
- Gottesman, M. M. (2002). *Mechanisms of cancer drug resistance*. *Annu Rev Med* **53**: 615-27.
- Gourmelon, C., J. S. Frenel and M. Campone (2011). *Eribulin mesylate for the treatment of late-stage breast cancer*. *Expert Opin Pharmacother*.
- Gradishar, W. J., S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins and J. O'Shaughnessy (2005). *Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer*. *J Clin Oncol* **23**(31): 7794-803.
- Gruenheid, S. and B. B. Finlay (2003). *Microbial pathogenesis and cytoskeletal function*. *Nature* **422**(6933): 775-81.
- Grutzmann, R., B. Molnar, C. Pilarsky, J. K. Habermann, P. M. Schlag, H. D. Saeger, S. Miehke, T. Stolz, F. Model, U. J. Roblick, H. P. Bruch, R. Koch, V. Liebenberg, T. Devos, X. Song, R. H. Day, A. Z. Sledziewski and C. Lofton-Day (2008). *Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay*. *PLoS One* **3**(11): e3759.
- Gueritte-Voegelein, F., D. Guenard and P. Potier (1987). *Taxol and derivatives: a biogenetic hypothesis*. *J Nat Prod* **50**(1): 9-18.
- Guillaud, L., C. Bosc, A. Fourest-Lieuvin, E. Denarier, F. Pirollet, L. Lafanechere and D. Job (1998). *STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells*. *J Cell Biol* **142**(1): 167-79.
- Gundersen, G. G. and J. C. Bulinski (1988). *Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(16): 5946-50.
- Gundersen, G. G. and T. A. Cook (1999). *Microtubules and signal transduction*. *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 81-94.
- Gurland, G. and G. G. Gundersen (1995). *Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts*. *J Cell Biol* **131**(5): 1275-90.
- Hafezparast, M., R. Klocke, C. Ruhrberg, A. Marquardt, A. Ahmad-Annuar, S. Bowen, G. Lalli, A. S. Witherden, H. Hummerich, S. Nicholson, P. J. Morgan, R. Oozageer, J. V. Priestley, S. Averill, V. R. King, S. Ball, J. Peters, T. Toda, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, M. Augustin, D. Korthaus, S. Wattler, P. Wabnitz, C. Dickneite, S. Lampel, F. Boehme, G. Peraus, A. Popp, M. Rudelius, J. Schlegel, H. Fuchs, M. Hrabe de Angelis, G. Schiavo, D. T. Shima, A. P. Russ, G. Stumm, J. E. Martin and E. M. Fisher (2003). *Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport*. *Science* **300**(5620): 808-12.
- Haimo, L. T. (1995). *Regulation of kinesin-directed movements*. *Trends Cell Biol* **5**(4): 165-8.
- Haldar, S., A. Basu and C. M. Croce (1997). *Bcl2 is the guardian of microtubule integrity*. *Cancer Res* **57**(2): 229-33.
- Hall, P. A., K. Jung, K. J. Hillan and S. E. Russell (2005a). *Expression profiling the human septin gene family*. *J Pathol* **206**(3): 269-78.
- Hall, P. A. and S. E. Russell (2004). *The pathobiology of the septin gene family*. *J Pathol* **204**(4): 489-505.
- Hall, P. A., C. B. Todd, P. L. Hyland, S. S. McDade, H. Grabsch, M. Dattani, K. J. Hillan and S. E. Russell (2005b). *The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors*. *Clin Cancer Res* **11**(19 Pt 1): 6780-6.
- Hamel, E., B. W. Day, J. H. Miller, M. K. Jung, P. T. Northcote, A. K. Ghosh, D. P. Curran, M. Cushman, K. C. Nicolaou, I. Paterson and E. J. Sorensen (2006). *Synergistic effects of*

- peloruside A and laulimalide with taxoid site drugs, but not with each other, on tubulin assembly.* *Mol Pharmacol* **70**(5): 1555-64.
- Hammond, J. W., D. Cai and K. J. Verhey (2008). *Tubulin modifications and their cellular functions.* *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 71-6.
- Hanai, N., K. Nagata, A. Kawajiri, T. Shiromizu, N. Saitoh, Y. Hasegawa, S. Murakami and M. Inagaki (2004). *Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11.* *FEBS Lett* **568**(1-3): 83-8.
- Hannibal, M. C., E. K. Ruzzo, L. R. Miller, B. Betz, J. G. Buchan, D. M. Knutzen, K. Barnett, M. L. Landsverk, A. Brice, E. LeGuern, H. M. Bedford, B. B. Worrall, S. Lovitt, S. H. Appel, E. Andermann, T. D. Bird and P. F. Chance (2009). *SEPT9 gene sequencing analysis reveals recurrent mutations in hereditary neuralgic amyotrophy.* *Neurology* **72**(20): 1755-9.
- Hari, M., F. Loganzo, T. Annable, X. Tan, S. Musto, D. B. Morilla, J. H. Nettles, J. P. Snyder and L. M. Greenberger (2006). *Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules.* *Mol Cancer Ther* **5**(2): 270-8.
- Hari, M., H. Yang, C. Zeng, M. Canizales and F. Cabral (2003). *Expression of class III beta-tubulin reduces microtubule assembly and confers resistance to paclitaxel.* *Cell Motil Cytoskeleton* **56**(1): 45-56.
- Hartwell, L. H. (1971). *Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis.* *Exp Cell Res* **69**(2): 265-76.
- Hazan, J., N. Fonknechten, D. Mavel, C. Paternotte, D. Samson, F. Artiguenave, C. S. Davoine, C. Cruaud, A. Durr, P. Wincker, P. Brottier, L. Cattolico, V. Barbe, J. M. Burgunder, J. F. Prud'homme, A. Brice, B. Fontaine, B. Heilig and J. Weissenbach (1999). *Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia.* *Nat Genet* **23**(3): 296-303.
- Hernandez-Vargas, H., J. Palacios and G. Moreno-Bueno (2007). *Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines.* *Cell Cycle* **6**(7): 780-3.
- Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka and S. Niwa (2009). *Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport.* *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(10): 682-96.
- Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, N. Kobayashi, K. K. Pfister, G. S. Bloom and S. T. Brady (1991). *Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo.* *J Cell Biol* **114**(2): 295-302.
- Hirokawa, N. and R. Takemura (2003). *Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins.* *Trends Biochem Sci* **28**(10): 558-65.
- Hiser, L., A. Aggarwal, R. Young, A. Frankfurter, A. Spano, J. J. Correia and S. Lobert (2006). *Comparison of beta-tubulin mRNA and protein levels in 12 human cancer cell lines.* *Cell Motil Cytoskeleton* **63**(1): 41-52.
- Hollenbeck, P. (2001). *Cytoskeleton: Microtubules get the signal.* *Curr Biol* **11**(20): R820-3.
- Holmfeldt, P., G. Brattsand and M. Gullberg (2002). *MAP4 counteracts microtubule catastrophe promotion but not tubulin-sequestering activity in intact cells.* *Curr Biol* **12**(12): 1034-9.
- Honnappa, S., O. Okhrimenko, R. Jaussi, H. Jawhari, I. Jelesarov, F. K. Winkler and M. O. Steinmetz (2006). *Key interaction modes of dynamic +TIP networks.* *Mol Cell* **23**(5): 663-71.
- Honore, S., E. Pasquier and D. Braguer (2005). *Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy.* *Cell Mol Life Sci* **62**(24): 3039-56.
- Hopper-Borge, E., Z. S. Chen, I. Shchavezleva, M. G. Belinsky and G. D. Kruh (2004). *Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel.* *Cancer Res* **64**(14): 4927-30.
- Hopper-Borge, E. A., T. Churchill, C. Paulose, E. Nicolas, J. D. Jacobs, O. Ngo, Y. Kuang, A. Grinberg, H. Westphal, Z. S. Chen, A. J. Klein-Szanto, M. G. Belinsky and G. D. Kruh (2010). *Contribution of Abcc10 (Mrp7) to in vivo paclitaxel resistance as assessed in Abcc10(-/-) mice.* *Cancer Res* **71**(10): 3649-57.
- Howard, J. (1996). *The movement of kinesin along microtubules.* *Annu Rev Physiol* **58**: 703-29.
- Howard, J., A. J. Hudspeth and R. D. Vale (1989). *Movement of microtubules by single kinesin molecules.* *Nature* **342**(6246): 154-8.
- Howard, J. and A. A. Hyman (2007). *Microtubule polymerases and depolymerases.* *Curr Opin Cell Biol* **19**(1): 31-5.

- Howard, J. and A. A. Hyman (2009). *Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends*. Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 569-74.
- Howell, B., H. Deacon and L. Cassimeris (1999). *Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo*. J Cell Sci **112** ( Pt 21): 3713-22.
- Hu, Q., W. J. Nelson and E. T. Spiliotis (2008). *Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics*. J Biol Chem **283**(43): 29563-71.
- Hua, X. H., D. Genini, R. Gussio, R. Tawatao, H. Shih, T. J. Kipps, D. A. Carson and L. M. Leoni (2001). *Biochemical genetic analysis of indanocine resistance in human leukemia*. Cancer Res **61**(19): 7248-54.
- Huang, H., S. Colella, M. Kurrer, Y. Yonekawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (2000a). *Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays*. Cancer Res **60**(24): 6868-74.
- Huang, T. S., C. H. Shu, Y. Chao, S. N. Chen and L. L. Chen (2000b). *Activation of MAD 2 checkpoint and persistence of cyclin B1/CDC 2 activity associate with paclitaxel-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells*. Apoptosis **5**(3): 235-41.
- Huang, Y. W., M. C. Surka, D. Reynaud, C. Pace-Asciak and W. S. Trimble (2006). *GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2*. Febs J **273**(14): 3248-60.
- Huang, Y. W., M. Yan, R. F. Collins, J. E. Diciccio, S. Grinstein and W. S. Trimble (2008). *Mammalian septins are required for phagosome formation*. Mol Biol Cell **19**(4): 1717-26.
- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X. F. Wang and T. P. Yao (2002). *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. Nature **417**(6887): 455-8.
- Huffman, K. E. and D. R. Corey (2005). *Major vault protein does not play a role in chemoresistance or drug localization in a non-small cell lung cancer cell line*. Biochemistry **44**(7): 2253-61.
- Huisman, M. T., A. A. Chhatta, O. van Tellingen, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2005). *MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid*. Int J Cancer **116**(5): 824-9.
- Hyman, A. and E. Karsenti (1998). *The role of nucleation in patterning microtubule networks*. J Cell Sci **111** ( Pt 15): 2077-83.
- Hyman, A. A. and E. Karsenti (1996). *Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly*. Cell **84**(3): 401-10.
- Iancu, C., S. J. Mistry, S. Arkin, S. Wallenstein and G. F. Atweh (2001). *Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle*. J Cell Sci **114**(Pt 5): 909-16.
- Ihara, M., A. Kinoshita, S. Yamada, H. Tanaka, A. Tanigaki, A. Kitano, M. Goto, K. Okubo, H. Nishiyama, O. Ogawa, C. Takahashi, S. Itoharu, Y. Nishimune, M. Noda and M. Kinoshita (2005). *Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa*. Dev Cell **8**(3): 343-52.
- Ihara, M., H. Tomimoto, H. Kitayama, Y. Morioka, I. Akiyoshi, H. Shibasaki, M. Noda and M. Kinoshita (2003). *Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies*. J Biol Chem **278**(26): 24095-102.
- Iida, J., T. J. Itoh, H. Hotani, K. Nishiyama, H. Murofushi, J. C. Bulinski and S. Hisanaga (2002). *The projection domain of MAP4 suppresses the microtubule-bundling activity of the microtubule-binding domain*. J Mol Biol **320**(1): 97-106.
- Ikegami, K., R. L. Heier, M. Taruishi, H. Takagi, M. Mukai, S. Shimma, S. Taira, K. Hatanaka, N. Morone, I. Yao, P. K. Campbell, S. Yuasa, C. Janke, G. R. Macgregor and M. Setou (2007). *Loss of alpha-tubulin polyglutamylase in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function*. Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3213-8.
- Ikegami, K., M. Mukai, J. Tsuchida, R. L. Heier, G. R. Macgregor and M. Setou (2006). *TLL7 is a mammalian beta-tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites*. J Biol Chem **281**(41): 30707-16.
- Inclan, Y. F. and E. Nogales (2001). *Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin*. J Cell Sci **114**(Pt 2): 413-22.
- Ito, H., I. Iwamoto, R. Morishita, Y. Nozawa, S. Narumiya, T. Asano and K. Nagata (2005). *Possible role of Rho/Rhotekin signaling in mammalian septin organization*. Oncogene **24**(47): 7064-72.

- Iwase, M., S. Okada, T. Oguchi and A. Toh-e (2004). *Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin, disturbs septin organization in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Genet Syst **79**(4): 199-206.
- Janke, C. and M. Kneussel (2010). *Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton*. Trends Neurosci **33**(8): 362-72.
- Janke, C., K. Rogowski and J. van Dijk (2008). *Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series*. EMBO Rep **9**(7): 636-41.
- Janke, C., K. Rogowski, D. Wloga, C. Regnard, A. V. Kajava, J. M. Strub, N. Temurak, J. van Dijk, D. Boucher, A. van Dorsselaer, S. Suryavanshi, J. Gaertig and B. Edde (2005). *Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family*. Science **308**(5729): 1758-62.
- Janmey, P. A., J. V. Shah, J. X. Tang and T. P. Stossel (2001). *Actin filament networks*. Results Probl Cell Differ **32**: 181-99.
- Jia, Z. F., P. Y. Pu, C. S. Kang, G. X. Wang, Z. Y. Zhang, M. Z. Qiu and Q. Huang (2007). *[Influence of SEPT7 on biological characters of glioma cell line TJ905]*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi **45**(20): 1420-3.
- Joberty, G., R. R. Perlungher, P. J. Sheffield, M. Kinoshita, M. Noda, T. Haystead and I. G. Macara (2001). *Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42*. Nat Cell Biol **3**(10): 861-6.
- John, C. M., R. K. Hite, C. S. Weirich, D. J. Fitzgerald, H. Jawhari, M. Faty, D. Schlapfer, R. Kroschewski, F. K. Winkler, T. Walz, Y. Barral and M. O. Steinmetz (2007). *The Caenorhabditis elegans septin complex is nonpolar*. Embo J **26**(14): 3296-307.
- Johnson, E. S. and G. Blobel (1999). *Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins*. J Cell Biol **147**(5): 981-94.
- Johnson, S. W., R. P. Perez, A. K. Godwin, A. T. Yeung, L. M. Handel, R. F. Ozols and T. C. Hamilton (1994). *Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines*. Biochem Pharmacol **47**(4): 689-97.
- Joo, E., M. C. Surka and W. S. Trimble (2007). *Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases*. Dev Cell **13**(5): 677-90.
- Jordan, M. A. (2002). *Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin*. Curr Med Chem Anticancer Agents **2**(1): 1-17.
- Jordan, M. A., K. Kamath, T. Manna, T. Okouneva, H. P. Miller, C. Davis, B. A. Littlefield and L. Wilson (2005). *The primary antimetabolic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth*. Mol Cancer Ther **4**(7): 1086-95.
- Jordan, M. A., D. Thrower and L. Wilson (1991). *Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids*. Cancer Res **51**(8): 2212-22.
- Jordan, M. A., R. J. Toso, D. Thrower and L. Wilson (1993). *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations*. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9552-6.
- Jordan, M. A., K. Wendell, S. Gardiner, W. B. Derry, H. Copp and L. Wilson (1996). *Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death*. Cancer Res **56**(4): 816-25.
- Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nat Rev Cancer **4**(4): 253-65.
- Kalikin, L. M., T. S. Frank, S. M. Svoboda-Newman, J. C. Wetzal, K. A. Cooney and E. M. Petty (1997). *A region of interstitial 17q25 allelic loss in ovarian tumors coincides with a defined region of loss in breast tumors*. Oncogene **14**(16): 1991-4.
- Kalikin, L. M., X. Qu, T. S. Frank, R. F. Caduff, S. M. Svoboda, D. J. Law and E. M. Petty (1996). *Detailed deletion analysis of sporadic breast tumors defines an interstitial region of allelic loss on 17q25*. Genes Chromosomes Cancer **17**(1): 64-8.
- Kalikin, L. M., H. L. Sims and E. M. Petty (2000). *Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors*. Genomics **63**(2): 165-72.
- Kalinina, E., R. Biswas, I. Berezniuk, A. Hermoso, F. X. Aviles and L. D. Fricker (2007). *A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases*. Faseb J **21**(3): 836-50.

- Kamath, K., T. Okouneva, G. Larson, D. Panda, L. Wilson and M. A. Jordan (2006). *2-Methoxyestradiol suppresses microtubule dynamics and arrests mitosis without depolymerizing microtubules*. *Mol Cancer Ther* **5**(9): 2225-33.
- Kamath, K., L. Wilson, F. Cabral and M. A. Jordan (2005). *BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability*. *J Biol Chem* **280**(13): 12902-7.
- Kang, B. H. and D. C. Altieri (2006). *Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*. *J Biol Chem* **281**(34): 24721-7.
- Kanzaki, A., M. Toi, K. Nakayama, H. Bando, M. Mutoh, T. Uchida, M. Fukumoto and Y. Takebayashi (2001). *Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma*. *Jpn J Cancer Res* **92**(4): 452-8.
- Kar, S., J. Fan, M. J. Smith, M. Goedert and L. A. Amos (2003). *Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol*. *Embo J* **22**(1): 70-7.
- Karcher, R. L., S. W. Deacon and V. I. Gelfand (2002). *Motor-cargo interactions: the key to transport specificity*. *Trends Cell Biol* **12**(1): 21-7.
- Karp, N. A. and K. S. Lilley (2007). *Design and analysis issues in quantitative proteomics studies*. *Proteomics* **7 Suppl 1**: 42-50.
- Kartmann, B. and D. Roth (2001). *Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis*. *J Cell Sci* **114**(Pt 5): 839-44.
- Kashiwaya, K., H. Nakagawa, M. Hosokawa, Y. Mochizuki, K. Ueda, L. Piao, S. Chung, R. Hamamoto, H. Eguchi, H. Ohigashi, O. Ishikawa, C. Janke, Y. Shinomura and Y. Nakamura (2010). *Involvement of the tubulin tyrosine ligase-like family member 4 polyglutamylase in PELP1 polyglutamylation and chromatin remodeling in pancreatic cancer cells*. *Cancer Res* **70**(10): 4024-33.
- Kavallaris, M., C. A. Burkhardt and S. B. Horwitz (1999). *Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol*. *Br J Cancer* **80**(7): 1020-5.
- Kavallaris, M., D. Y. Kuo, C. A. Burkhardt, D. L. Regl, M. D. Norris, M. Haber and S. B. Horwitz (1997). *Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes*. *J Clin Invest* **100**(5): 1282-93.
- Kavallaris, M., A. S. Tait, B. J. Walsh, L. He, S. B. Horwitz, M. D. Norris and M. Haber (2001). *Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells*. *Cancer Res* **61**(15): 5803-9.
- Kaverina, I., K. Rottner and J. V. Small (1998). *Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions*. *J Cell Biol* **142**(1): 181-90.
- Keating, T. J. and G. G. Borisy (1999). *Centrosomal and non-centrosomal microtubules*. *Biol Cell* **91**(4-5): 321-9.
- Kelling, J., K. Sullivan, L. Wilson and M. A. Jordan (2003). *Suppression of centromere dynamics by Taxol in living osteosarcoma cells*. *Cancer Res* **63**(11): 2794-801.
- Khan, I. A. and R. F. Luduena (1996). *Phosphorylation of beta III-tubulin*. *Biochemistry* **35**(12): 3704-11.
- Khrapunovich-Baine, M., V. Menon, P. Verdier-Pinard, A. B. Smith, 3rd, R. H. Angeletti, A. Fiser, S. B. Horwitz and H. Xiao (2009). *Distinct pose of discodermolide in taxol binding pocket drives a complementary mode of microtubule stabilization*. *Biochemistry* **48**(49): 11664-77.
- Kienitz, A., C. Vogel, I. Morales, R. Muller and H. Bastians (2005). *Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol*. *Oncogene* **24**(26): 4301-10.
- Kikkawa, M., T. Ishikawa, T. Nakata, T. Wakabayashi and N. Hirokawa (1994). *Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo*. *J Cell Biol* **127**(6 Pt 2): 1965-71.
- Kim, D. S., S. L. Hubbard, A. Peraud, B. Salhia, K. Sakai and J. T. Rutka (2004). *Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors*. *Neoplasia* **6**(2): 168-78.
- Kimura, Y., N. Kurabe, K. Ikegami, K. Tsutsumi, Y. Konishi, O. I. Kaplan, H. Kunitomo, Y. Iino, O. E. Blacque and M. Setou (2010). *Identification of tubulin deglutamylase among Caenorhabditis elegans and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs)*. *J Biol Chem* **285**(30): 22936-41.

- Kinoshita, A., M. Kinoshita, H. Akiyama, H. Tomimoto, I. Akiguchi, S. Kumar, M. Noda and J. Kimura (1998). *Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Am J Pathol* **153**(5): 1551-60.
- Kinoshita, K., T. L. Noetzel, I. Arnal, D. N. Drechsel and A. A. Hyman (2006). *Global and local control of microtubule destabilization promoted by a catastrophe kinesin MCAK/XKCM1*. *J Muscle Res Cell Motil* **27**(2): 107-14.
- Kinoshita, M. (2003a). *Assembly of mammalian septins*. *J Biochem* **134**(4): 491-6.
- Kinoshita, M. (2003b). *The septins*. *Genome Biol* **4**(11): 236.
- Kinoshita, M., C. M. Field, M. L. Coughlin, A. F. Straight and T. J. Mitchison (2002). *Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins*. *Dev Cell* **3**(6): 791-802.
- Kinoshita, M., S. Kumar, A. Mizoguchi, C. Ide, A. Kinoshita, T. Haraguchi, Y. Hiraoka and M. Noda (1997). *Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures*. *Genes Dev* **11**(12): 1535-47.
- Kinoshita, M. and M. Noda (2001). *Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery*. *Cell Struct Funct* **26**(6): 667-70.
- Kirschner, M. W. (1978). *Microtubule assembly and nucleation*. *Int Rev Cytol* **54**: 1-71.
- Klar, U., B. Buchmann, W. Schwede, W. Skuballa, J. Hoffmann and R. B. Lichtner (2006). *Total synthesis and antitumor activity of ZK-EPO: the first fully synthetic epothilone in clinical development*. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(47): 7942-8.
- Knuefermann, C., Y. Lu, B. Liu, W. Jin, K. Liang, L. Wu, M. Schmidt, G. B. Mills, J. Mendelsohn and Z. Fan (2003). *HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells*. *Oncogene* **22**(21): 3205-12.
- Kojima, K., I. Sakai, A. Hasegawa, H. Niiya, T. Azuma, Y. Matsuo, N. Fujii, M. Tanimoto and S. Fujita (2004). *FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23)*. *Leukemia* **18**(5): 998-1005.
- Komarova, Y. A., A. S. Akhmanova, S. Kojima, N. Galjart and G. G. Borisy (2002a). *Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo*. *J Cell Biol* **159**(4): 589-99.
- Komarova, Y. A., I. A. Vorobjev and G. G. Borisy (2002b). *Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary*. *J Cell Sci* **115**(Pt 17): 3527-39.
- Kops, G. J., B. A. Weaver and D. W. Cleveland (2005). *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. *Nat Rev Cancer* **5**(10): 773-85.
- Kreis, T. E. (1987). *Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic*. *Embo J* **6**(9): 2597-606.
- Kremer, B. E., T. Haystead and I. G. Macara (2005). *Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4*. *Mol Biol Cell* **16**(10): 4648-59.
- Kroger, N., W. Achterrath, S. Hegewisch-Becker, K. Mross and A. R. Zander (1999). *Current options in treatment of anthracycline-resistant breast cancer*. *Cancer Treat Rev* **25**(5): 279-91.
- Kuhlenbaumer, G., M. C. Hannibal, E. Nelis, A. Schirmacher, N. Verpoorten, J. Meuleman, G. D. Watts, E. De Vriendt, P. Young, F. Stogbauer, H. Halfter, J. Irobi, D. Goossens, J. Del-Favero, B. G. Betz, H. Hor, G. Kurlemann, T. D. Bird, E. Airaksinen, T. Mononen, A. P. Serradell, J. M. Prats, C. Van Broeckhoven, P. De Jonghe, V. Timmerman, E. B. Ringelstein and P. F. Chance (2005). *Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy*. *Nat Genet* **37**(10): 1044-6.
- Kuznetsov, S. A., G. M. Langford and D. G. Weiss (1992). *Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm*. *Nature* **356**(6371): 722-5.
- Lacroix, B., J. van Dijk, N. D. Gold, J. Guizetti, G. Aldrian-Herrada, K. Rogowski, D. W. Gerlich and C. Janke (2010). *Tubulin polyglutamylolation stimulates spastin-mediated microtubule severing*. *J Cell Biol* **189**(6): 945-54.
- Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* **227**(5259): 680-5.



- Lafanechere, L., C. Courtoy-Cahen, T. Kawakami, M. Jacrot, M. Rudiger, J. Wehland, D. Job and R. L. Margolis (1998). *Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth*. *J Cell Sci* **111** ( Pt 2): 171-81.
- Laferriere, N. B. and D. L. Brown (1996). *Expression and posttranslational modification of class III beta-tubulin during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells*. *Cell Motil Cytoskeleton* **35**(3): 188-99.
- Lahm, H. W. and H. Langen (2000). *Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels*. *Electrophoresis* **21**(11): 2105-14.
- Lantz, V. A. and K. G. Miller (1998). *A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of Drosophila embryos*. *J Cell Biol* **140**(4): 897-910.
- Larcher, J. C., D. Boucher, S. Lazereg, F. Gros and P. Denoulet (1996). *Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation*. *J Biol Chem* **271**(36): 22117-24.
- Larisch, S. (2004). *The ARTS connection: role of ARTS in apoptosis and cancer*. *Cell Cycle* **3**(8): 1021-3.
- Lawrence, C. J., R. K. Dawe, K. R. Christie, D. W. Cleveland, S. C. Dawson, S. A. Endow, L. S. Goldstein, H. V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R. L. Malmberg, J. R. McIntosh, H. Miki, T. J. Mitchison, Y. Okada, A. S. Reddy, W. M. Saxton, M. Schliwa, J. M. Scholey, R. D. Vale, C. E. Walczak and L. Wordeman (2004). *A standardized kinesin nomenclature*. *J Cell Biol* **167**(1): 19-22.
- Lee, F. Y., R. Borzilleri, C. R. Fairchild, S. H. Kim, B. H. Long, C. Reventos-Suarez, G. D. Vite, W. C. Rose and R. A. Kramer (2001). *BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy*. *Clin Cancer Res* **7**(5): 1429-37.
- Lee, S. Y., J. W. Kim, M. H. Jeong, J. H. An, S. M. Jang, K. H. Song and K. H. Choi (2008). *Microtubule-associated protein 1B light chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells*. *FEBS Lett* **582**(19): 2826-32.
- Leipe, D. D., Y. I. Wolf, E. V. Koonin and L. Aravind (2002). *Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases*. *J Mol Biol* **317**(1): 41-72.
- Leonessa, F. and R. Clarke (2003). *ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer*. *Endocr Relat Cancer* **10**(1): 43-73.
- Liao, G. and G. G. Gundersen (1998). *Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin*. *J Biol Chem* **273**(16): 9797-803.
- Liebmann, J. E., J. A. Cook, C. Lipschultz, D. Teague, J. Fisher and J. B. Mitchell (1993). *Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines*. *Br J Cancer* **68**(6): 1104-9.
- Lin, B., L. Catley, R. LeBlanc, C. Mitsiades, R. Burger, Y. T. Tai, K. Podar, M. Wartmann, D. Chauhan, J. D. Griffin and K. C. Anderson (2005). *Patupilone (epothilone B) inhibits growth and survival of multiple myeloma cells in vitro and in vivo*. *Blood* **105**(1): 350-7.
- Lin, N. U., L. M. Parker, S. E. Come, H. J. Burstein, M. Haldoupis, N. Ryabin, R. Gelman, E. P. Winer and L. N. Shulman (2007). *Phase II study of CT-2103 as first- or second-line chemotherapy in patients with metastatic breast cancer: unexpected incidence of hypersensitivity reactions*. *Invest New Drugs* **25**(4): 369-75.
- Lin, S. X., G. G. Gundersen and F. R. Maxfield (2002). *Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin*. *Mol Biol Cell* **13**(1): 96-109.
- Lindsey, R. and M. Momany (2006). *Septin localization across kingdoms: three themes with variations*. *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 559-65.
- Liu, J., M. J. Towle, H. Cheng, P. Saxton, C. Reardon, J. Wu, E. A. Murphy, G. Kuznetsov, C. W. Johannes, M. R. Tremblay, H. Zhao, M. Pesant, F. G. Fang, M. W. Vermeulen, B. M. Gallagher, Jr. and B. A. Littlefield (2007). *In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic (-)-laulimalide, a marine natural product microtubule stabilizing agent*. *Anticancer Res* **27**(3B): 1509-18.

- Liu, M., S. Shen, F. Chen, W. Yu and L. Yu (2010a). *Linking the septin expression with carcinogenesis*. Mol Biol Rep.
- Liu, M., S. Shen, F. Chen, W. Yu and L. Yu (2010b). *Linking the septin expression with carcinogenesis*. Mol Biol Rep **37**(7): 3601-8.
- Lofton-Day, C., F. Model, T. Devos, R. Tetzner, J. Distler, M. Schuster, X. Song, R. Lesche, V. Liebenberg, M. Ebert, B. Molnar, R. Grutzmann, C. Pilarsky and A. Sledziewski (2008). *DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening*. Clin Chem **54**(2): 414-23.
- Longtine, M. S., D. J. DeMarini, M. L. Valencik, O. S. Al-Awar, H. Fares, C. De Virgilio and J. R. Pringle (1996). *The septins: roles in cytokinesis and other processes*. Curr Opin Cell Biol **8**(1): 106-19.
- Low, I., P. Dancker and T. Wieland (1975). *Stabilization of F-actin by phalloidin. Reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B*. FEBS Lett **54**(2): 263-5.
- Luduena, R. F. (1998). *Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications*. Int Rev Cytol **178**: 207-75.
- Luduena, R. F., A. Banerjee and I. A. Khan (1992). *Tubulin structure and biochemistry*. Curr Opin Cell Biol **4**(1): 53-7.
- Lukoyanova, N., S. A. Baldwin and J. Trinick (2008). *3D reconstruction of mammalian septin filaments*. J Mol Biol **376**(1): 1-7.
- Ma, X. J., R. Salunga, J. T. Tuggle, J. Gaudet, E. Enright, P. McQuary, T. Payette, M. Pistone, K. Stecker, B. M. Zhang, Y. X. Zhou, H. Varnholt, B. Smith, M. Gadd, E. Chatfield, J. Kessler, T. M. Baer, M. G. Erlander and D. C. Sgroi (2003). *Gene expression profiles of human breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5974-9.
- Macara, I. G., R. Baldarelli, C. M. Field, M. Glotzer, Y. Hayashi, S. C. Hsu, M. B. Kennedy, M. Kinoshita, M. Longtine, C. Low, L. J. Maltais, L. McKenzie, T. J. Mitchison, T. Nishikawa, M. Noda, E. M. Petty, M. Peifer, J. R. Pringle, P. J. Robinson, D. Roth, S. E. Russell, H. Stuhlmann, M. Tanaka, T. Tanaka, W. S. Trimble, J. Ware, N. J. Zeleznik-Le and B. Zieger (2002). *Mammalian septins nomenclature*. Mol Biol Cell **13**(12): 4111-3.
- MacKeigan, J. P., D. J. Taxman, D. Hunter, H. S. Earp, 3rd, L. M. Graves and J. P. Ting (2002). *Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase kinase inhibition*. Clin Cancer Res **8**(7): 2091-9.
- MacRae, T. H. (1997). *Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action*. Eur J Biochem **244**(2): 265-78.
- Magnani, M., G. Maccari, J. M. Andreu, J. F. Diaz and M. Botta (2009). *Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores*. Febs J **276**(10): 2701-12.
- Makrides, V., M. R. Massie, S. C. Feinstein and J. Lew (2004). *Evidence for two distinct binding sites for tau on microtubules*. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6746-51.
- Mallik, R. and S. P. Gross (2004). *Molecular motors: strategies to get along*. Curr Biol **14**(22): R971-82.
- Malz, M., A. Weber, S. Singer, V. Riehmer, M. Bissinger, M. O. Riener, T. Longerich, C. Soll, A. Vogel, P. Angel, P. Schirmacher and K. Breuhahn (2009). *Overexpression of far upstream element binding proteins: a mechanism regulating proliferation and migration in liver cancer cells*. Hepatology **50**(4): 1130-9.
- Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow (1995). *Microtubules and microtubule-associated proteins*. Curr Opin Cell Biol **7**(1): 72-81.
- Mandelkow, E. M., E. Mandelkow and R. A. Milligan (1991). *Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study*. J Cell Biol **114**(5): 977-91.
- Mandelkow, E. M., E. Thies, B. Trinczek, J. Biernat and E. Mandelkow (2004). *MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons*. J Cell Biol **167**(1): 99-110.
- Manfredi, J. J., J. Parness and S. B. Horwitz (1982). *Taxol binds to cellular microtubules*. J Cell Biol **94**(3): 688-96.
- Manna, T., D. Thrower, H. P. Miller, P. Curmi and L. Wilson (2006). *Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro*. J Biol Chem **281**(4): 2071-8.

- Marani, M., T. Tenev, D. Hancock, J. Downward and N. R. Lemoine (2002). *Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis*. *Mol Cell Biol* **22**(11): 3577-89.
- Marceiller, J., A. Drechou, G. Durand, F. Perez and C. Pous (2005). *Kinesin is involved in protecting nascent microtubules from disassembly after recovery from nocodazole treatment*. *Exp Cell Res* **304**(2): 483-92.
- Margolis, R. L. and L. Wilson (1978). *Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro*. *Cell* **13**(1): 1-8.
- Marks, D. L., J. M. Larkin and M. A. McNiven (1994). *Association of kinesin with the Golgi apparatus in rat hepatocytes*. *J Cell Sci* **107** ( Pt 9): 2417-26.
- Martello, L. A., P. Verdier-Pinard, H. J. Shen, L. He, K. Torres, G. A. Orr and S. B. Horwitz (2003). *Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation*. *Cancer Res* **63**(6): 1207-13.
- Martin, O. C., R. N. Gunawardane, A. Iwamatsu and Y. Zheng (1998). *Xgrip109: a gamma tubulin-associated protein with an essential role in gamma tubulin ring complex (gammaTuRC) assembly and centrosome function*. *J Cell Biol* **141**(3): 675-87.
- Martinez, C., J. Corral, J. A. Dent, L. Sesma, V. Vicente and J. Ware (2006). *Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network*. *J Thromb Haemost* **4**(6): 1388-95.
- Martinez-Exposito, M. J., K. B. Kaplan, J. Copeland and P. K. Sorger (1999). *Retention of the BUB3 checkpoint protein on lagging chromosomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8493-8.
- Maruta, H., K. Greer and J. L. Rosenbaum (1986). *The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules*. *J Cell Biol* **103**(2): 571-9.
- Marx, A., J. Pless, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (2000). *On the rigidity of the cytoskeleton: are MAPs crosslinkers or spacers of microtubules?* *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**(5): 949-65.
- Mary, J., V. Redeker, J. P. Le Caer, J. C. Prome and J. Rossier (1994). *Class I and IVa beta-tubulin isotypes expressed in adult mouse brain are glutamylated*. *FEBS Lett* **353**(1): 89-94.
- Matov, A., K. Applegate, P. Kumar, C. Thoma, W. Krek, G. Danuser and T. Wittmann (2010). *Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker*. *Nat Methods* **7**(9): 761-8.
- McCann, A. H., P. A. Dervan, M. O'Regan, M. B. Codd, W. J. Gullick, B. M. Tobin and D. N. Carney (1991). *Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer*. *Cancer Res* **51**(12): 3296-303.
- McDade, S. S., P. A. Hall and S. E. Russell (2007). *Translational control of SEPT9 isoforms is perturbed in disease*. *Hum Mol Genet* **16**(7): 742-52.
- McDaid, H. M. and S. B. Horwitz (2001). *Selective potentiation of paclitaxel (taxol)-induced cell death by mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in human cancer cell lines*. *Mol Pharmacol* **60**(2): 290-301.
- McGrogan, B. T., B. Gilmartin, D. N. Carney and A. McCann (2008). *Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer*. *Biochim Biophys Acta* **1785**(2): 96-132.
- McIlhatton, M. A., J. F. Burrows, P. G. Donaghy, S. Chanduloy, P. G. Johnston and S. E. Russell (2001). *Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3*. *Oncogene* **20**(41): 5930-9.
- McNally, F. J. (1999). *Microtubule dynamics: Controlling split ends*. *Curr Biol* **9**(8): R274-6.
- McNally, F. J., K. Okawa, A. Iwamatsu and R. D. Vale (1996). *Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes*. *J Cell Sci* **109** ( Pt 3): 561-7.
- McNally, F. J. and R. D. Vale (1993). *Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules*. *Cell* **75**(3): 419-29.
- McNally, K., A. Audhya, K. Oegema and F. J. McNally (2006). *Katanin controls mitotic and meiotic spindle length*. *J Cell Biol* **175**(6): 881-91.
- Megiorni, F., B. Mora, P. Indovina and M. C. Mazzilli (2005). *Expression of neuronal markers during Ntera2/cloneD1 differentiation by cell aggregation method*. *Neurosci Lett* **373**(2): 105-9.
- Megonigal, M. D., E. F. Rappaport, D. H. Jones, T. M. Williams, B. D. Lovett, K. M. Kelly, P. H. Lerou, T. Moulton, M. L. Budarf and C. A. Felix (1998). *t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the*

- genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes.* Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6413-8.
- Melhem, R., N. Hailat, R. Kuick and S. M. Hanash (1997). *Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia.* Leukemia **11**(10): 1690-5.
- Meyer, C., B. Schneider, S. Jakob, S. Strehl, A. Attarbaschi, S. Schnittger, C. Schoch, M. W. Jansen, J. J. van Dongen, M. L. den Boer, R. Pieters, M. G. Ennas, E. Angelucci, U. Koehl, J. Greil, F. Griesinger, U. Zur Stadt, C. Eckert, T. Szczepanski, F. K. Niggli, B. W. Schafer, H. Kempfski, H. J. Brady, J. Zuna, J. Trka, L. L. Nigro, A. Biondi, E. Delabesse, E. Macintyre, M. Stanulla, M. Schrappe, O. A. Haas, T. Burmeister, T. Dingermann, T. Klingebiel and R. Marschalek (2006). *The MLL recombinome of acute leukemias.* Leukemia **20**(5): 777-84.
- Mialhe, A., L. Lafanechere, I. Treilleux, N. Peloux, C. Dumontet, A. Bremond, M. H. Panh, R. Payan, J. Wehland, R. L. Margolis and D. Job (2001). *Tubulin deetyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis.* Cancer Res **61**(13): 5024-7.
- Michielsen, D. P., J. G. Braeckman and L. Denis (2011). *Cabazitaxel for the treatment of prostate cancer.* Expert Opin Pharmacother **12**(6): 977-82.
- Miller, K., M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Perez, T. Shenkier, D. Cella and N. E. Davidson (2007). *Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer.* N Engl J Med **357**(26): 2666-76.
- Mimori, K., N. Sadanaga, Y. Yoshikawa, K. Ishikawa, M. Hashimoto, F. Tanaka, A. Sasaki, H. Inoue, K. Sugimachi and M. Mori (2006). *Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment.* Br J Cancer **94**(12): 1894-7.
- Minin, A. A. (1997). *Dispersal of Golgi apparatus in nocodazole-treated fibroblasts is a kinesin-driven process.* J Cell Sci **110** ( Pt 19): 2495-505.
- Minotti, A. M., S. B. Barlow and F. Cabral (1991). *Resistance to antimetabolic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin.* J Biol Chem **266**(6): 3987-94.
- Mita, A. C., L. A. Hammond, P. L. Bonate, G. Weiss, H. McCreery, S. Syed, M. Garrison, Q. S. Chu, J. S. DeBono, C. B. Jones, S. Weitman and E. K. Rowinsky (2006). *Phase I and pharmacokinetic study of tasidotin hydrochloride (ILX651), a third-generation dolastatin-15 analogue, administered weekly for 3 weeks every 28 days in patients with advanced solid tumors.* Clin Cancer Res **12**(17): 5207-15.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). *Dynamic instability of microtubule growth.* Nature **312**(5991): 237-42.
- Mitchison, T. J. and C. M. Field (2002). *Cytoskeleton: what does GTP do for septins?* Curr Biol **12**(22): R788-90.
- Mizuno, M. and S. J. Singer (1994). *A possible role for stable microtubules in intracellular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus.* J Cell Sci **107** ( Pt 5): 1321-31.
- Mocz, G. and I. R. Gibbons (1996). *Phase partition analysis of nucleotide binding to axonemal dynein.* Biochemistry **35**(28): 9204-11.
- Mok, T. S., E. Choi, D. Yau, A. Johri, W. Yeo, A. T. Chan and C. Wong (2006). *Effects of patupilone (epothilone B; EPO906), a novel chemotherapeutic agent, in hepatocellular carcinoma: an in vitro study.* Oncology **71**(3-4): 292-6.
- Mollinedo, F. and C. Gajate (2003). *Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis.* Apoptosis **8**(5): 413-50.
- Montagna, C., M. S. Lyu, K. Hunter, L. Lukes, W. Lowther, T. Reppert, B. Hisson, Z. Weaver and T. Ried (2003). *The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines.* Cancer Res **63**(9): 2179-87.
- Moores, C. A. and R. A. Milligan (2006). *Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors.* J Cell Sci **119**(Pt 19): 3905-13.
- Moos, P. J. and F. A. Fitzpatrick (1998). *Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits.* Cell Growth Differ **9**(8): 687-97.
- Morris, P. G. and M. N. Fornier (2008). *Microtubule active agents: beyond the taxane frontier.* Clin Cancer Res **14**(22): 7167-72.
- Morrison, E. E. (2007). *Action and interactions at microtubule ends.* Cell Mol Life Sci **64**(3): 307-17.

- Mostowy, S., M. Bonazzi, M. A. Hamon, T. N. Tham, A. Mallet, M. Lelek, E. Gouin, C. Demangel, R. Brosch, C. Zimmer, A. Sartori, M. Kinoshita, M. Lecuit and P. Cossart (2010). *Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures*. *Cell Host Microbe* **8**(5): 433-44.
- Mostowy, S., T. Nam Tham, A. Danckaert, S. Guadagnini, S. Boisson-Dupuis, J. Pizarro-Cerda and P. Cossart (2009). *Septins regulate bacterial entry into host cells*. *PLoS One* **4**(1): e4196.
- Moutin, M. J., A. Andrieux and C. Janke (2011). *[Microtubule polyglutamylation and neurodegeneration]*. *Med Sci (Paris)* **27**(5): 464-7.
- Mozzetti, S., C. Ferlini, P. Concolino, F. Filippetti, G. Raspaglio, S. Prislei, D. Gallo, E. Martinelli, F. O. Ranelletti, G. Ferrandina and G. Scambia (2005). *Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients*. *Clin Cancer Res* **11**(1): 298-305.
- Mukai, M., K. Ikegami, Y. Sugiura, K. Takeshita, A. Nakagawa and M. Setou (2009). *Recombinant mammalian tubulin polyglutamylase TLL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on beta-tubulin through a random sequential pathway*. *Biochemistry* **48**(5): 1084-93.
- Murofushi, H. (1980). *Purification and characterization of tubulin-tyrosine ligase from porcine brain*. *J Biochem* **87**(3): 979-84.
- Murphy, M., A. Hinman and A. J. Levine (1996). *Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein*. *Genes Dev* **10**(23): 2971-80.
- Nagasaki, T., G. Liao and G. G. Gundersen (1994). *Isolated plasma membranes induce the loss of oriented detyrosinated microtubules and other contact inhibition-like responses in migrating NRK cells*. *J Cell Sci* **107** ( Pt 12): 3413-23.
- Nagata, K., T. Asano, Y. Nozawa and M. Inagaki (2004). *Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11*. *J Biol Chem* **279**(53): 55895-904.
- Nagata, K. and M. Inagaki (2005). *Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin*. *Oncogene* **24**(1): 65-76.
- Nagata, K., A. Kawajiri, S. Matsui, M. Takagishi, T. Shiromizu, N. Saitoh, I. Izawa, T. Kiyono, T. J. Itoh, H. Hotani and M. Inagaki (2003). *Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules*. *J Biol Chem* **278**(20): 18538-43.
- Nakahira, M., J. N. Macedo, T. V. Seraphim, N. Cavalcante, T. A. Souza, J. C. Damalio, L. F. Reyes, E. M. Assmann, M. R. Alborghetti, R. C. Garratt, A. P. Araujo, N. I. Zanchin, J. A. Barbosa and J. Kobarg (2010). *A Draft of the Human Septin Interactome*. *PLoS One* **5**(11): e13799.
- Neufeld, T. P. and G. M. Rubin (1994). *The Drosophila peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins*. *Cell* **77**(3): 371-9.
- Newton, C. N., M. Wagenbach, Y. Ovechkina, L. Wordeman and L. Wilson (2004). *MCAK, a Kin I kinesin, increases the catastrophe frequency of steady-state HeLa cell microtubules in an ATP-dependent manner in vitro*. *FEBS Lett* **572**(1-3): 80-4.
- Nguyen, H. L., D. Gruber and J. C. Bulinski (1999). *Microtubule-associated protein 4 (MAP4) regulates assembly, protomer-polymer partitioning and synthesis of tubulin in cultured cells*. *J Cell Sci* **112** ( Pt 12): 1813-24.
- Nguyen, T. Q., H. Sawa, H. Okano and J. G. White (2000). *The C. elegans septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis*. *J Cell Sci* **113** Pt 21: 3825-37.
- NicAmhlaibh, R., M. Heenan, I. Cleary, S. Touhey, C. O'Loughlin, C. Daly, G. Nunez, K. J. Scanlon and M. Clynes (1999). *Altered expression of mRNAs for apoptosis-modulating proteins in a low level multidrug resistant variant of a human lung carcinoma cell line that also expresses mdr1 mRNA*. *Int J Cancer* **82**(3): 368-76.
- Nicholson, B., G. K. Lloyd, B. R. Miller, M. A. Palladino, Y. Kiso, Y. Hayashi and S. T. Neuteboom (2006). *NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent*. *Anticancer Drugs* **17**(1): 25-31.
- Nicoletti, M. I., G. Valoti, P. Giannakakou, Z. Zhan, J. H. Kim, V. Lucchini, F. Landoni, J. G. Mayo, R. Giavazzi and T. Fojo (2001). *Expression of beta-tubulin isotypes in human ovarian carcinoma xenografts and in a sub-panel of human cancer cell lines from the NCI-Anticancer*

- Drug Screen: correlation with sensitivity to microtubule active agents.* Clin Cancer Res **7**(9): 2912-22.
- Nislow, C., V. A. Lombillo, R. Kuriyama and J. R. McIntosh (1992). *A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles.* Nature **359**(6395): 543-7.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.* Cell **81**(1): 53-62.
- Nogales, E. (1999). *A structural view of microtubule dynamics.* Cell Mol Life Sci **56**(1-2): 133-42.
- Nogales, E. (2000). *Structural insights into microtubule function.* Annu Rev Biochem **69**: 277-302.
- Nogales, E., S. G. Wolf and K. H. Downing (1998). *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.* Nature **391**(6663): 199-203.
- North, B. J. and E. Verdin (2004). *Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases.* Genome Biol **5**(5): 224.
- Oakley, B. R. (1995). *Cell biology. A nice ring to the centrosome.* Nature **378**(6557): 555-6.
- Oegema, K., M. S. Savoian, T. J. Mitchison and C. M. Field (2000). *Functional analysis of a human homologue of the Drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis.* J Cell Biol **150**(3): 539-52.
- O'Farrell, P. H. (1975). *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem **250**(10): 4007-21.
- Ohkawa, N., S. Sugisaki, E. Tokunaga, K. Fujitani, T. Hayasaka, M. Setou and K. Inokuchi (2008). *N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development.* Genes Cells **13**(11): 1171-83.
- Ohta, S., K. Nishio, N. Kubota, T. Ohmori, Y. Funayama, T. Ohira, H. Nakajima, M. Adachi and N. Saijo (1994). *Characterization of a taxol-resistant human small-cell lung cancer cell line.* Jpn J Cancer Res **85**(3): 290-7.
- Olivier, M., R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris and P. Hainaut (2002). *The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users.* Hum Mutat **19**(6): 607-14.
- Olmsted, J. B. (1986). *Microtubule-associated proteins.* Annu Rev Cell Biol **2**: 421-57.
- Ookata, K., S. Hisanaga, J. C. Bulinski, H. Murofushi, H. Aizawa, T. J. Itoh, H. Hotani, E. Okumura, K. Tachibana and T. Kishimoto (1995). *Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics.* J Cell Biol **128**(5): 849-62.
- O'Reilly, T., M. Wartmann, S. M. Maira, M. Hattenberger, J. Vaxelaire, M. Muller, S. Ferretti, E. Buchdunger, K. H. Altmann and P. M. McSheehy (2005). *Patupilone (epothilone B, EPO906) and imatinib (STI571, Glivec) in combination display enhanced antitumour activity in vivo against experimental rat C6 glioma.* Cancer Chemother Pharmacol **55**(4): 307-17.
- Orr, G. A., P. Verdier-Pinard, H. McDaid and S. B. Horwitz (2003). *Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules.* Oncogene **22**(47): 7280-95.
- Osaka, M., J. D. Rowley and N. J. Zeleznik-Le (1999). *MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25).* Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6428-33.
- Ozols, J. and J. M. Caron (1997). *Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation.* Mol Biol Cell **8**(4): 637-45.
- Pablo-Hernando, M. E., Y. Arnaiz-Pita, H. Tachikawa, F. del Rey, A. M. Neiman and C. R. Vazquez de Aldana (2008). *Septins localize to microtubules during nutritional limitation in Saccharomyces cerevisiae.* BMC Cell Biol **9**: 55.
- Pan, F., R. L. Malmberg and M. Momany (2007). *Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs.* BMC Evol Biol **7**: 103.
- Panda, D., H. P. Miller, A. Banerjee, R. F. Luduena and L. Wilson (1994). *Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition.* Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11358-62.

- Paradiso, A., A. Mangia, A. Chiriatti, S. Tommasi, A. Zito, A. Latorre, F. Schittulli and V. Lorusso (2005). *Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer*. *Ann Oncol* **16 Suppl 4**: iv14-19.
- Parness, J. and S. B. Horwitz (1981). *Taxol binds to polymerized tubulin in vitro*. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1): 479-87.
- Parysek, L. M., C. F. Asnes and J. B. Olmsted (1984). *MAP 4: occurrence in mouse tissues*. *J Cell Biol* **99**(4 Pt 1): 1309-15.
- Paschal, B. M., S. M. King, A. G. Moss, C. A. Collins, R. B. Vallee and G. B. Witman (1987). *Isolated flagellar outer arm dynein translocates brain microtubules in vitro*. *Nature* **330**(6149): 672-4.
- Pasquier, E. and M. Kavallaris (2008). *Microtubules: a dynamic target in cancer therapy*. *IUBMB Life* **60**(3): 165-70.
- Patel, P. C., K. H. Fisher, E. C. Yang, C. M. Deane and R. E. Harrison (2009). *Proteomic analysis of microtubule-associated proteins during macrophage activation*. *Mol Cell Proteomics* **8**(11): 2500-14.
- Pathak, N., T. Obara, S. Mangos, Y. Liu and I. A. Drummond (2007). *The zebrafish fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation*. *Mol Biol Cell* **18**(11): 4353-64.
- Pathak, N. H. and I. A. Drummond (2009). *Polyglutamylation and the fleer gene*. *Methods Cell Biol* **94**: 317-32.
- Pazour, G. J., B. L. Dickert and G. B. Witman (1999). *The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly*. *J Cell Biol* **144**(3): 473-81.
- Pechart, I., M. L. Kann, N. Levilliers, M. H. Bre and J. P. Fouquet (1999). *Composition and organization of tubulin isoforms reveals a variety of axonemal models*. *Biol Cell* **91**(9): 685-97.
- Pedrotti, B., A. Soffientini and K. Islam (1993). *Sulphonate buffers affect the recovery of microtubule-associated proteins MAP1 and MAP2: evidence that MAP1A promotes microtubule assembly*. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**(3): 234-42.
- Perdiz, D., R. Mackeh, C. Pous and A. Baillet (2011). *The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification?* *Cell Signal* **23**(5): 763-71.
- Perez, E. A. (2009). *Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance*. *Mol Cancer Ther* **8**(8): 2086-95.
- Perez, F., G. S. Diamantopoulos, R. Stalder and T. E. Kreis (1999). *CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo*. *Cell* **96**(4): 517-27.
- Peris, L., M. Thery, J. Faure, Y. Saoudi, L. Lafanechere, J. K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux and D. Job (2006). *Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends*. *J Cell Biol* **174**(6): 839-49.
- Peris, L., M. Wagenbach, L. Lafanechere, J. Brocard, A. T. Moore, F. Kozielski, D. Job, L. Wordeman and A. Andrieux (2009). *Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination*. *J Cell Biol* **185**(7): 1159-66.
- Perrotton, T., D. Trompier, X. B. Chang, A. Di Pietro and H. Baubichon-Cortay (2007). *(R)- and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1*. *J Biol Chem* **282**(43): 31542-8.
- Peterson, E. A. and E. M. Petty (2010). *Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease*. *Clin Genet* **77**(6): 511-24.
- Petrak, J., R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, J. Zivny and C. D. Vulpe (2008). *Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins*. *Proteomics* **8**(9): 1744-9.
- Phung, A. D., K. Soucek, L. Kubala, R. W. Harper, J. Chloe Bulinski and J. P. Eiserich (2006). *Posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells*. *Eur J Cell Biol* **85**(12): 1241-52.
- Phung-Koskas, T., A. Pilon, C. Pous, C. Betzina, M. Sturm, M. L. Bourguet-Kondracki, G. Durand and A. Drechou (2005). *STAT5B-mediated growth hormone signaling is organized by highly dynamic microtubules in hepatic cells*. *J Biol Chem* **280**(2): 1123-31.

- Piehler, A. P., M. Hellum, J. J. Wenzel, E. Kaminski, K. B. Haug, P. Kierulf and W. E. Kaminski (2008). *The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference*. BMC Genomics **9**: 165.
- Pizarro-Cerda, J., R. Jonquieres, E. Gouin, J. Vandekerckhove, J. Garin and P. Cossart (2002). *Distinct protein patterns associated with Listeria monocytogenes InlA- or InlB-phagosomes*. Cell Microbiol **4**(2): 101-15.
- Plosker, G. L. and S. J. Keam (2006). *Trastuzumab: a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer*. Drugs **66**(4): 449-75.
- Poruchynsky, M. S., P. Giannakakou, Y. Ward, J. C. Bulinski, W. G. Telford, R. W. Robey and T. Fojo (2001). *Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism*. Biochem Pharmacol **62**(11): 1469-80.
- Pourroy, B., S. Honore, E. Pasquier, V. Bourgarel-Rey, A. Kruczynski, C. Briand and D. Braguer (2006). *Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells*. Cancer Res **66**(6): 3256-63.
- Poüs, C., K. Chabin, A. Drechou, L. Barbot, T. Phung-Koskas, C. Settegrana, M. L. Bourguet-Kondracki, M. Maurice, D. Cassio, M. Guyot and G. Durand (1998). *Functional specialization of stable and dynamic microtubules in protein traffic in WIF-B cells*. J Cell Biol **142**(1): 153-65.
- Powers, J., O. Bossinger, D. Rose, S. Strome and W. Saxton (1998). *A nematode kinesin required for cleavage furrow advancement*. Curr Biol **8**(20): 1133-6.
- Pratt, W. B., Y. Morishima, M. Murphy and M. Harrell (2006). *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. Handb Exp Pharmacol(172): 111-38.
- Pusztai, L., P. Wagner, N. Ibrahim, E. Rivera, R. Theriault, D. Booser, F. W. Symmans, F. Wong, G. Blumenschein, D. R. Fleming, R. Rouzier, G. Boniface and G. N. Hortobagyi (2005). *Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma*. Cancer **104**(4): 682-91.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King and A. Strasser (1999). *The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex*. Mol Cell **3**(3): 287-96.
- Puthalakath, H., A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang and A. Strasser (2001). *Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis*. Science **293**(5536): 1829-32.
- Qi, M., W. Yu, S. Liu, H. Jia, L. Tang, M. Shen, X. Yan, H. Saiyin, Q. Lang, B. Wan, S. Zhao and L. Yu (2005). *Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B*. Biochem Biophys Res Commun **336**(3): 994-1000.
- Raff, E. C., J. D. Fackenthal, J. A. Hutchens, H. D. Hoyle and F. R. Turner (1997). *Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform*. Science **275**(5296): 70-3.
- Rai, S. S. and J. Wolff (1998). *The C terminus of beta-tubulin regulates vinblastine-induced tubulin polymerization*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4253-7.
- Raich, W. B., A. N. Moran, J. H. Rothman and J. Hardin (1998). *Cytokinesis and midzone microtubule organization in Caenorhabditis elegans require the kinesin-like protein ZEN-4*. Mol Biol Cell **9**(8): 2037-49.
- Ranganathan, S., C. A. Benetatos, P. J. Colarusso, D. W. Dexter and G. R. Hudes (1998). *Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells*. Br J Cancer **77**(4): 562-6.
- Rao, S., G. A. Orr, A. G. Chaudhary, D. G. Kingston and S. B. Horwitz (1995). *Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin*. J Biol Chem **270**(35): 20235-8.
- Redeker, V., J. P. Le Caer, J. Rossier and J. C. Prome (1991). *Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to alpha-tubulin*. J Biol Chem **266**(34): 23461-6.
- Redeker, V., R. Melki, D. Prome, J. P. Le Caer and J. Rossier (1992). *Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated*. FEBS Lett **313**(2): 185-92.



- Redeker, V., J. Rossier and A. Frankfurter (1998). *Posttranslational modifications of the C-terminus of alpha-tubulin in adult rat brain: alpha 4 is glutamylated at two residues*. *Biochemistry* **37**(42): 14838-44.
- Redmond, T., E. R. Sanchez, E. H. Bresnick, M. J. Schlesinger, D. O. Toft, W. B. Pratt and M. J. Welsh (1989). *Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells*. *Eur J Cell Biol* **50**(1): 66-75.
- Reed, J. C. and J. R. Bischoff (2000). *BIRing chromosomes through cell division--and survivin' the experience*. *Cell* **102**(5): 545-8.
- Reed, N. A., D. Cai, T. L. Blasius, G. T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig and K. J. Verhey (2006). *Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport*. *Curr Biol* **16**(21): 2166-72.
- Regnard, C., E. Desbruyeres, P. Denoulet and B. Edde (1999). *Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells*. *J Cell Sci* **112** ( Pt **23**): 4281-9.
- Regnard, C., E. Desbruyeres, J. C. Huet, C. Beauvallet, J. C. Pernollet and B. Edde (2000). *Polyglutamylated nucleosome assembly proteins*. *J Biol Chem* **275**(21): 15969-76.
- Reinecke, P., T. Kalinski, C. Mahotka, M. Schmitz, M. Dejosez, H. E. Gabbert and C. D. Gerharz (2005). *Paclitaxel/Taxol sensitivity in human renal cell carcinoma is not determined by the p53 status*. *Cancer Lett* **222**(2): 165-71.
- Rieder, C. L. and H. Maiato (2004). *Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint*. *Dev Cell* **7**(5): 637-51.
- Riely, G. J., S. Gadgeel, I. Rothman, B. Saidman, K. Sabbath, K. Feit, M. G. Kris and N. A. Rizvi (2007). *A phase 2 study of TZT-1027, administered weekly to patients with advanced non-small cell lung cancer following treatment with platinum-based chemotherapy*. *Lung Cancer* **55**(2): 181-5.
- Rizk, R. S., K. P. Bohannon, L. A. Wetzel, J. Powers, S. L. Shaw and C. E. Walczak (2009). *MCAK and paclitaxel have differential effects on spindle microtubule organization and dynamics*. *Mol Biol Cell* **20**(6): 1639-51.
- Roberts, J. R., E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, J. Robertson and D. C. Allison (1989). *Demonstration of the cell cycle positions of taxol-induced "asters" and "bundles" by sequential measurements of tubulin immunofluorescence, DNA content, and autoradiographic labeling of taxol-sensitive and -resistant cells*. *J Histochem Cytochem* **37**(11): 1659-65.
- Robertson, C., S. W. Church, H. A. Nagar, J. Price, P. A. Hall and S. E. Russell (2004). *Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding*. *J Pathol* **203**(1): 519-27.
- Rodionov, V., E. Nadezhdina and G. Borisy (1999). *Centrosomal control of microtubule dynamics*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 115-20.
- Rodionov, V. I. and G. G. Borisy (1997). *Microtubule treadmill in vivo*. *Science* **275**(5297): 215-8.
- Rodionov, V. I., A. J. Hope, T. M. Svitkina and G. G. Borisy (1998). *Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores*. *Curr Biol* **8**(3): 165-8.
- Rodriguez, O. C., A. W. Schaefer, C. A. Mandato, P. Forscher, W. M. Bement and C. M. Waterman-Storer (2003). *Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis*. *Nat Cell Biol* **5**(7): 599-609.
- Rogowski, K., J. van Dijk, M. M. Magiera, C. Bosc, J. C. Deloulme, A. Bosson, L. Peris, N. D. Gold, B. Lacroix, M. B. Grau, N. Bec, C. Larroque, S. Desagher, M. Holzer, A. Andrieux, M. J. Moutin and C. Janke (2010). *A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration*. *Cell* **143**(4): 564-78.
- Romond, E. H., E. A. Perez, J. Bryant, V. J. Suman, C. E. Geyer, Jr., N. E. Davidson, E. Tan-Chiu, S. Martino, S. Paik, P. A. Kaufman, S. M. Swain, T. M. Pisansky, L. Fehrenbacher, L. A. Kutteh, V. G. Vogel, D. W. Visscher, G. Yothers, R. B. Jenkins, A. M. Brown, S. R. Dakhil, E. P. Mamounas, W. L. Lingle, P. M. Klein, J. N. Ingle and N. Wolmark (2005). *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. *N Engl J Med* **353**(16): 1673-84.
- Rosa, J., P. Canovas, A. Islam, D. C. Altieri and S. J. Doxsey (2006). *Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle*. *Mol Biol Cell* **17**(3): 1483-93.
- Rosenbaum, J. (2000). *Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last*. *Curr Biol* **10**(21): R801-3.

- Rouzier, R., R. Rajan, P. Wagner, K. R. Hess, D. L. Gold, J. Stec, M. Ayers, J. S. Ross, P. Zhang, T. A. Buchholz, H. Kuerer, M. Green, B. Arun, G. N. Hortobagyi, W. F. Symmans and L. Pusztai (2005). *Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8315-20.
- Rowinsky, E. K. and E. Calvo (2006). *Novel agents that target tubulin and related elements*. Semin Oncol **33**(4): 421-35.
- Rubin, C. I. and G. F. Atweh (2004). *The role of stathmin in the regulation of the cell cycle*. J Cell Biochem **93**(2): 242-50.
- Rudiger, M., U. Plessman, K. D. Kloppel, J. Wehland and K. Weber (1992). *Class II tubulin, the major brain beta tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435*. FEBS Lett **308**(1): 101-5.
- Rudiger, M., J. Wehland and K. Weber (1994). *The carboxy-terminal peptide of dephosphorylated alpha tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase*. Eur J Biochem **220**(2): 309-20.
- Ruiz, F., A. Krzywicka, C. Klotz, A. Keller, J. Cohen, F. Koll, G. Balavoine and J. Beisson (2000). *The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in Paramecium, encodes a novel tubulin, eta-tubulin*. Curr Biol **10**(22): 1451-4.
- Russell, S. E. and P. A. Hall (2005). *Do septins have a role in cancer?* Br J Cancer **93**(5): 499-503.
- Russell, S. E. and P. A. Hall (2011). *Septin genomics: a road less travelled*. Biol Chem **392**(8-9): 763-7.
- Russell, S. E., M. A. McIlhatton, J. F. Burrows, P. G. Donaghy, S. Chanduloy, E. M. Petty, L. M. Kalikin, S. W. Church, S. McIlroy, D. P. Harkin, G. W. Keilty, A. N. Cranston, J. Weissenbach, I. Hickey and P. G. Johnston (2000). *Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors*. Cancer Res **60**(17): 4729-34.
- Sahab, Z. J., M. D. Hall, Y. Me Sung, S. Dakshnamurthy, Y. Ji, D. Kumar and S. W. Byers (2011). *Tumor suppressor RARRES1 interacts with cytoplasmic carboxypeptidase AGL2 to regulate the alpha-tubulin tyrosination cycle*. Cancer Res **71**(4): 1219-28.
- Sakai, K., M. Kurimoto, A. Tsugu, S. L. Hubbard, W. S. Trimble and J. T. Rutka (2002). *Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors*. J Neurooncol **57**(3): 169-77.
- Sakamoto, T., A. Uezu, S. Kawauchi, T. Kuramoto, K. Makino, K. Umeda, N. Araki, H. Baba and H. Nakanishi (2008). *Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain*. Genes Cells **13**(4): 295-312.
- Sakato, M. and S. M. King (2004). *Design and regulation of the AAA+ microtubule motor dynein*. J Struct Biol **146**(1-2): 58-71.
- Sale, S., R. Sung, P. Shen, K. Yu, Y. Wang, G. E. Duran, J. H. Kim, T. Fojo, P. J. Oefner and B. I. Sikic (2002). *Conservation of the class I beta-tubulin gene in human populations and lack of mutations in lung cancers and paclitaxel-resistant ovarian cancers*. Mol Cancer Ther **1**(3): 215-25.
- Samsø, M., M. Radermacher, J. Frank and M. P. Koonce (1998). *Structural characterization of a dynein motor domain*. J Mol Biol **276**(5): 927-37.
- Sanchez, C., J. Diaz-Nido and J. Avila (2000). *Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function*. Prog Neurobiol **61**(2): 133-68.
- Sandrock, K., I. Bartsch, S. Blaser, A. Busse, E. Busse and B. Zieger (2011). *Characterization of human septin interactions*. Biol Chem **392**(8-9): 751-61.
- Sangrajang, S., P. Denoulet, N. M. Laing, R. Tatoud, G. Millot, F. Calvo, K. D. Tew and A. Fellous (1998). *Association of estramustine resistance in human prostatic carcinoma cells with modified patterns of tubulin expression*. Biochem Pharmacol **55**(3): 325-31.
- Schibler, M. J., S. B. Barlow and F. Cabral (1989). *Elimination of permeability mutants from selections for drug resistance in mammalian cells*. Faseb J **3**(2): 163-8.
- Schiff, P. B., J. Fant and S. B. Horwitz (1979). *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. Nature **277**(5698): 665-7.
- Schiff, P. B. and S. B. Horwitz (1980). *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1561-5.

- Schinkel, A. H., U. Mayer, E. Wagenaar, C. A. Mol, L. van Deemter, J. J. Smit, M. A. van der Valk, A. C. Voordouw, H. Spits, O. van Tellingen, J. M. Zijlmans, W. E. Fibbe and P. Borst (1997). *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4028-33.
- Schmid-Alliana, A., L. Menou, S. Manie, H. Schmid-Antomarchi, M. A. Millet, S. Giuriato, B. Ferrua and B. Rossi (1998). *Microtubule integrity regulates src-like and extracellular signal-regulated kinase activities in human pro-monocytic cells. Importance for interleukin-1 production*. J Biol Chem **273**(6): 3394-400.
- Schmidt, K. and B. J. Nichols (2004). *Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton*. BMC Cell Biol **5**(1): 43.
- Schneider, A., U. Plessmann, R. Felleisen and K. Weber (1998). *Posttranslational modifications of trichomonad tubulins; identification of multiple glutamylation sites*. FEBS Lett **429**(3): 399-402.
- Schneider, J., R. Lucas, J. Sanchez, A. Ruibal, A. Tejerina and M. Martin (2000). *Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP*. Anticancer Res **20**(6B): 4373-7.
- Schneider, J. and H. Romero (1995). *Correlation of P-glycoprotein overexpression and cellular prognostic factors in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples from breast cancer patients*. Anticancer Res **15**(3): 1117-21.
- Schulze, E. and M. Kirschner (1987). *Dynamic and stable populations of microtubules in cells*. J Cell Biol **104**(2): 277-88.
- Schumacher, J. M., A. Golden and P. J. Donovan (1998). *AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in Caenorhabditis elegans embryos*. J Cell Biol **143**(6): 1635-46.
- Scott, M., P. L. Hyland, G. McGregor, K. J. Hillan, S. E. Russell and P. A. Hall (2005). *Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours*. Oncogene **24**(29): 4688-700.
- Scott, M., W. G. McCluggage, K. J. Hillan, P. A. Hall and S. E. Russell (2006). *Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis*. Int J Cancer **118**(5): 1325-9.
- Sellin, M. E., L. Sandblad, S. Stenmark and M. Gullberg (2011). *Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes*. Mol Biol Cell.
- Sessa, C., A. Perotti, A. Llado, S. Cresta, G. Capri, M. Voi, S. Marsoni, I. Corradino and L. Gianni (2007). *Phase I clinical study of the novel epothilone B analogue BMS-310705 given on a weekly schedule*. Ann Oncol **18**(9): 1548-53.
- Sezgin, C., B. Karabulut, R. Uslu, U. A. Sanli, G. Goksel, O. Zekioglu, N. Ozdemir and E. Goker (2005). *Potential predictive factors for response to weekly paclitaxel treatment in patients with metastatic breast cancer*. J Chemother **17**(1): 96-103.
- Shao, Y. Y., K. T. Kuo, F. C. Hu, Y. S. Lu, C. S. Huang, J. Y. Liao, W. C. Lee, C. Hsu, W. H. Kuo, K. J. Chang, C. H. Lin and A. L. Cheng (2010). *Predictive and prognostic values of tau and ERCC1 in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and cisplatin*. Jpn J Clin Oncol **40**(4): 286-93.
- Sharp, D. J., G. C. Rogers and J. M. Scholey (2000). *Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in Drosophila embryos*. Nat Cell Biol **2**(12): 922-30.
- She, Y. M., Y. W. Huang, L. Zhang and W. S. Trimble (2004). *Septin 2 phosphorylation: theoretical and mass spectrometric evidence for the existence of a single phosphorylation site in vivo*. Rapid Commun Mass Spectrom **18**(10): 1123-30.
- Sheffield, P. J., C. J. Oliver, B. E. Kremer, S. Sheng, Z. Shao and I. G. Macara (2003). *Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments*. J Biol Chem **278**(5): 3483-8.
- Shi, J., J. D. Orth and T. Mitchison (2008). *Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5*. Cancer Res **68**(9): 3269-76.

- Shinohara-Gotoh, Y., E. Nishida, M. Hoshi and H. Sakai (1991). *Activation of microtubule-associated protein kinase by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 cells*. *Exp Cell Res* **193**(1): 161-6.
- Shionoya, M., T. Jimbo, M. Kitagawa, T. Soga and A. Tohgo (2003). *DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro and in vivo*. *Cancer Sci* **94**(5): 459-66.
- Shtutman, M., A. Chausovsky, M. Prager-Khoutorsky, N. Schiefermeier, S. Boguslavsky, Z. Kam, E. Fuchs, B. Geiger, G. G. Borisy and A. D. Bershadsky (2008). *Signaling function of alpha-catenin in microtubule regulation*. *Cell Cycle* **7**(15): 2377-83.
- Sibley, L. D. (2004). *Intracellular parasite invasion strategies*. *Science* **304**(5668): 248-53.
- Sikic, B. I. (1997). *Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance*. *Semin Hematol* **34**(4 Suppl 5): 40-7.
- Silverman-Gavrila, R. V. and L. B. Silverman-Gavrila (2008). *Septins: new microtubule interacting partners*. *ScientificWorldJournal* **8**: 611-20.
- Sirajuddin, M., M. Farkasovsky, F. Hauer, D. Kuhlmann, I. G. Macara, M. Weyand, H. Stark and A. Wittinghofer (2007). *Structural insight into filament formation by mammalian septins*. *Nature* **449**(7160): 311-5.
- Sirajuddin, M., M. Farkasovsky, E. Zent and A. Wittinghofer (2009). *GTP-induced conformational changes in septins and implications for function*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(39): 16592-7.
- Sitz, J. H., K. Baumgartel, B. Hammerle, C. Papadopoulos, P. Hekerman, F. J. Tejedor, W. Becker and B. Lutz (2008). *The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4*. *Neuroscience* **157**(3): 596-605.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd (1990). *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. *J Natl Cancer Inst* **82**(13): 1107-12.
- Skop, A. R. and J. G. White (1998). *The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early Caenorhabditis elegans embryos*. *Curr Biol* **8**(20): 1110-6.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich and et al. (1989). *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. *Science* **244**(4905): 707-12.
- Small, J. V. and I. Kaverina (2003). *Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity*. *Curr Opin Cell Biol* **15**(1): 40-7.
- Smith, A. E. and A. Helenius (2004). *How viruses enter animal cells*. *Science* **304**(5668): 237-42.
- Smoter, M., L. Bodnar, R. Duchnowska, R. Stec, B. Grala and C. Szczylik (2011). *The role of Tau protein in resistance to paclitaxel*. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**(3): 553-7.
- Smrzka, O. W., N. Delgehr and M. Bornens (2000). *Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian delta-tubulin*. *Curr Biol* **10**(7): 413-6.
- Snyder, J. P. (2007). *The microtubule-pore gatekeeper*. *Nat Chem Biol* **3**(2): 81-2.
- Song, Y. H. and E. Mandelkow (1993). *Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1671-5.
- Sorensen, A. B., A. H. Lund, S. Ethelberg, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and F. S. Pedersen (2000). *Sint1, a common integration site in SL3-3-induced T-cell lymphomas, harbors a putative proto-oncogene with homology to the septin gene family*. *J Virol* **74**(5): 2161-8.
- Sorger, P. K., M. Dobles, R. Tournebize and A. A. Hyman (1997). *Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics*. *Curr Opin Cell Biol* **9**(6): 807-14.
- Soucek, K., A. Kamaid, A. D. Phung, L. Kubala, J. C. Bulinski, R. W. Harper and J. P. Eiserich (2006). *Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of alpha-tubulin posttranslational modifications*. *Prostate* **66**(9): 954-65.
- Spiliotis, E. T. (2010). *Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases*. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**(6): 339-45.
- Spiliotis, E. T., S. J. Hunt, Q. Hu, M. Kinoshita and W. J. Nelson (2008). *Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules*. *J Cell Biol* **180**(2): 295-303.

- Spiliotis, E. T., M. Kinoshita and W. J. Nelson (2005). *A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation*. *Science* **307**(5716): 1781-5.
- Spiliotis, E. T. and W. J. Nelson (2006). *Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization*. *J Cell Sci* **119**(Pt 1): 4-10.
- Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2002). *Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress*. *J Cell Biol* **156**(6): 1051-63.
- Steen, J. A., H. Steen, A. Georgi, K. Parker, M. Springer, M. Kirchner, F. Hamprecht and M. W. Kirschner (2008). *Different phosphorylation states of the anaphase promoting complex in response to antimetabolic drugs: a quantitative proteomic analysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(16): 6069-74.
- Stengel, C., S. P. Newman, M. P. Leese, B. V. Potter, M. J. Reed and A. Purohit (2010). *Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents*. *Br J Cancer* **102**(2): 316-24.
- Straight, A. F. and C. M. Field (2000). *Microtubules, membranes and cytokinesis*. *Curr Biol* **10**(20): R760-70.
- Surka, M. C., C. W. Tsang and W. S. Trimble (2002). *The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis*. *Mol Biol Cell* **13**(10): 3532-45.
- Suryavanshi, S., B. Edde, L. A. Fox, S. Guerrero, R. Hard, T. Hennessey, A. Kabi, D. Malison, D. Pennock, W. S. Sale, D. Wloga and J. Gaertig (2010). *Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity*. *Curr Biol* **20**(5): 435-40.
- Tada, T., A. Simonetta, M. Batterton, M. Kinoshita, D. Edbauer and M. Sheng (2007). *Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons*. *Curr Biol* **17**(20): 1752-8.
- Takahashi, M., J. Kigawa, Y. Minagawa, H. Itamochi, M. Shimada, S. Kamazawa, S. Sato, R. Akeshima and N. Terakawa (2000). *Sensitivity to paclitaxel is not related to p53-dependent apoptosis in ovarian cancer cells*. *Eur J Cancer* **36**(14): 1863-8.
- Takahashi, Y., M. Iwase, M. Konishi, M. Tanaka, A. Toh-e and Y. Kikuchi (1999). *Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast*. *Biochem Biophys Res Commun* **259**(3): 582-7.
- Takei, Y., J. Teng, A. Harada and N. Hirokawa (2000). *Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes*. *J Cell Biol* **150**(5): 989-1000.
- Tan, M., T. Jing, K. H. Lan, C. L. Neal, P. Li, S. Lee, D. Fang, Y. Nagata, J. Liu, R. Arlinghaus, M. C. Hung and D. Yu (2002). *Phosphorylation on tyrosine-15 of p34(Cdc2) by ErbB2 inhibits p34(Cdc2) activation and is involved in resistance to taxol-induced apoptosis*. *Mol Cell* **9**(5): 993-1004.
- Tanaka, M., H. Kijima, J. Itoh, T. Matsuda and T. Tanaka (2002). *Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer in vitro and in vivo*. *Cancer Gene Ther* **9**(6): 483-8.
- Tanaka, S., T. Nohara, M. Iwamoto, K. Sumiyoshi, K. Kimura, Y. Takahashi and N. Tanigawa (2009). *Tau expression and efficacy of paclitaxel treatment in metastatic breast cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**(2): 341-6.
- Tasto, J. J., J. L. Morrell and K. L. Gould (2003). *An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation*. *J Cell Biol* **160**(7): 1093-103.
- Teng, J., Y. Takei, A. Harada, T. Nakata, J. Chen and N. Hirokawa (2001). *Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization*. *J Cell Biol* **155**(1): 65-76.
- Terada, S., M. Kinjo and N. Hirokawa (2000). *Oligomeric tubulin in large transporting complex is transported via kinesin in squid giant axons*. *Cell* **103**(1): 141-55.
- Thazhath, R., M. Jerka-Dziadosz, J. Duan, D. Wloga, M. A. Gorovsky, J. Frankel and J. Gaertig (2004). *Cell context-specific effects of the beta-tubulin glycylation domain on assembly and size of microtubular organelles*. *Mol Biol Cell* **15**(9): 4136-47.

- Tokuraku, K., K. Matsushima, T. Matui, H. Nakagawa, M. Katsuki, R. Majima and S. Kotani (2003). *The number of repeat sequences in microtubule-associated protein 4 affects the microtubule surface properties*. J Biol Chem **278**(32): 29609-18.
- Tommasi, S., A. Mangia, R. Lacalamita, A. Bellizzi, V. Fedele, A. Chiriatti, C. Thomssen, N. Kendzierski, A. Latorre, V. Lorusso, F. Schittulli, F. Zito, M. Kavallaris and A. Paradiso (2007). *Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins*. Int J Cancer **120**(10): 2078-85.
- Tooley, A. J., J. Gilden, J. Jacobelli, P. Beemiller, W. S. Trimble, M. Kinoshita and M. F. Krummel (2009). *Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility*. Nat Cell Biol **11**(1): 17-26.
- Toppmeyer, D., A. D. Seidman, M. Pollak, C. Russell, K. Tkaczuk, S. Verma, B. Overmoyer, V. Garg, E. Ette, M. W. Harding and G. D. Demetri (2002). *Safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor Incel (biricodar; VX-710) in combination with paclitaxel for advanced breast cancer refractory to paclitaxel*. Clin Cancer Res **8**(3): 670-8.
- Torres, K. and S. B. Horwitz (1998). *Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent*. Cancer Res **58**(16): 3620-6.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tran Van Nhieu, G., E. Caron, A. Hall and P. J. Sansonetti (1999). *IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during Shigella entry into epithelial cells*. Embo J **18**(12): 3249-62.
- Trichet, V., M. Ruault, G. Roizes and A. De Sario (2000). *Characterization of the human tubulin tyrosine ligase-like 1 gene (TTL1) mapping to 22q13.1*. Gene **257**(1): 109-17.
- Tsukamoto, F., E. Shiba, T. Taguchi, T. Sugimoto, T. Watanabe, S. J. Kim, Y. Tanji, Y. Kimoto, M. Izukura and S. I. Takai (1997). *Immunohistochemical Detection of P-glycoprotein in Breast Cancer and Its Significance as a Prognostic Factor*. Breast Cancer **4**(4): 259-263.
- Tubiana-Hulin, M. (2005). *How to maximize the efficacy of taxanes in breast cancer*. Cancer Treat Rev **31 Suppl 4**: S3-9.
- Ueda, K., C. Cardarelli, M. M. Gottesman and I. Pastan (1987). *Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine*. Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 3004-8.
- Ulitzur, N., M. Humbert and S. R. Pfeffer (1997). *Mapmodulin: a possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules*. Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5084-9.
- Uren, A. G., L. Wong, M. Pakusch, K. J. Fowler, F. J. Burrows, D. L. Vaux and K. H. Choo (2000). *Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype*. Curr Biol **10**(21): 1319-28.
- Vaillant, A. R., R. Muller, A. Langkopf and D. L. Brown (1998). *Characterization of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1A and its effects on microtubule dynamics*. J Biol Chem **273**(22): 13973-81.
- Vale, R. D., R. Case, E. Sablin, C. Hart and R. Fletterick (2000). *Searching for kinesin's mechanical amplifier*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1396): 449-57.
- Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz (1985). *Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility*. Cell **42**(1): 39-50.
- Valiron, O., N. Caudron and D. Job (2001). *Microtubule dynamics*. Cell Mol Life Sci **58**(14): 2069-84.
- van Ark-Otte, J., G. Samelis, G. Rubio, J. B. Lopez Saez, H. M. Pinedo and G. Giaccone (1998). *Effects of tubulin-inhibiting agents in human lung and breast cancer cell lines with different multidrug resistance phenotypes*. Oncol Rep **5**(1): 249-55.
- van Dijk, J., K. Rogowski, J. Miro, B. Lacroix, B. Edde and C. Janke (2007). *A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation*. Mol Cell **26**(3): 437-48.
- Vaughan, P. S., J. D. Leszyk and K. T. Vaughan (2001). *Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin*. J Biol Chem **276**(28): 26171-9.
- Vaughan, S., T. Attwood, M. Navarro, V. Scott, P. McKean and K. Gull (2000). *New tubulins in protozoal parasites*. Curr Biol **10**(7): R258-9.

- Vega, I. E. and S. C. Hsu (2003). *The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells*. *Neuroreport* **14**(1): 31-7.
- Verdier-Pinard, P., S. Shahabi, F. Wang, B. Burd, H. Xiao, G. L. Goldberg, G. A. Orr and S. B. Horwitz (2005). *Detection of human betaV-tubulin expression in epithelial cancer cell lines by tubulin proteomics*. *Biochemistry* **44**(48): 15858-70.
- Versele, M. and J. Thorner (2005). *Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual*. *Trends Cell Biol* **15**(8): 414-24.
- Villeneuve, D. J., S. L. Hembruff, Z. Veitch, M. Cecchetto, W. A. Dew and A. M. Parissenti (2006). *cDNA microarray analysis of isogenic paclitaxel- and doxorubicin-resistant breast tumor cell lines reveals distinct drug-specific genetic signatures of resistance*. *Breast Cancer Res Treat* **96**(1): 17-39.
- Vinogradova, T., P. M. Miller and I. Kaverina (2009). *Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array*. *Cell Cycle* **8**(14): 2168-74.
- Vorobjev, I. A., V. I. Rodionov, I. V. Maly and G. G. Borisy (1999). *Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover*. *J Cell Sci* **112** ( Pt **14**): 2277-89.
- Vrabioiu, A. M., S. A. Gerber, S. P. Gygi, C. M. Field and T. J. Mitchison (2004). *The majority of the Saccharomyces cerevisiae septin complexes do not exchange guanine nucleotides*. *J Biol Chem* **279**(4): 3111-8.
- Vrabioiu, A. M. and T. J. Mitchison (2006). *Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy*. *Nature* **443**(7110): 466-9.
- Wade, R. H. and A. A. Hyman (1997). *Microtubule structure and dynamics*. *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 12-7.
- Wagner, P., B. Wang, E. Clark, H. Lee, R. Rouzier and L. Pusztai (2005). *Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: a novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo*. *Cell Cycle* **4**(9): 1149-52.
- Walczak, C. E. (2003). *The Kin I kinesins are microtubule end-stimulated ATPases*. *Mol Cell* **11**(2): 286-8.
- Wang, T., J. Parris, L. Li and J. I. Morgan (2006a). *The carboxypeptidase-like substrate-binding site in Nnal is essential for the rescue of the Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype*. *Mol Cell Neurosci* **33**(2): 200-13.
- Wang, Y., L. Serfass, M. O. Roy, J. Wong, A. M. Bonneau and E. Georges (2004). *Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells*. *Biochem Biophys Res Commun* **314**(2): 565-70.
- Wang, Y., S. Yin, K. Blade, G. Cooper, D. R. Menick and F. Cabral (2006b). *Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms*. *Biochemistry* **45**(1): 185-94.
- Warnick, C. T., B. Dabbas, C. D. Ford and K. A. Strait (2001). *Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells*. *J Biol Chem* **276**(29): 27363-70.
- Waters, J. C., R. H. Chen, A. W. Murray and E. D. Salmon (1998). *Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension*. *J Cell Biol* **141**(5): 1181-91.
- Weber, K., A. Schneider, S. Westermann, N. Muller and U. Plessmann (1997). *Posttranslational modifications of alpha- and beta-tubulin in Giardia lamblia, an ancient eukaryote*. *FEBS Lett* **419**(1): 87-91.
- Webster, D. R., J. Wehland, K. Weber and G. G. Borisy (1990). *Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo*. *J Cell Biol* **111**(1): 113-22.
- Weinstein, J. N., T. G. Myers, P. M. O'Connor, S. H. Friend, A. J. Fornace, Jr., K. W. Kohn, T. Fojo, S. E. Bates, L. V. Rubinstein, N. L. Anderson, J. K. Buolamwini, W. W. van Osdol, A. P. Monks, D. A. Scudiero, E. A. Sausville, D. W. Zaharevitz, B. Bunow, V. N. Viswanadhan, G. S. Johnson, R. E. Wittes and K. D. Paull (1997). *An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer*. *Science* **275**(5298): 343-9.
- Weirich, C. S., J. P. Erzberger and Y. Barral (2008). *The septin family of GTPases: architecture and dynamics*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(6): 478-89.

- West, R. R., K. M. Tenbarge and J. B. Olmsted (1991). *A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences.* J Biol Chem **266**(32): 21886-96.
- Westermann, S. and K. Weber (2003). *Post-translational modifications regulate microtubule function.* Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 938-47.
- White, J. and S. Strome (1996). *Cleavage plane specification in C. elegans: how to divide the spoils.* Cell **84**(2): 195-8.
- Wilmes, A., K. Bargh, C. Kelly, P. T. Northcote and J. H. Miller (2007). *Peloruside A synergizes with other microtubule stabilizing agents in cultured cancer cell lines.* Mol Pharm **4**(2): 269-80.
- Wloga, D., D. Dave, J. Meagley, K. Rogowski, M. Jerka-Dziadosz and J. Gaertig (2010). *Hyperglutamylation of tubulin can either stabilize or destabilize microtubules in the same cell.* Eukaryot Cell **9**(1): 184-93.
- Wloga, D. and J. Gaertig (2010). *Post-translational modifications of microtubules.* J Cell Sci **123**(Pt 20): 3447-55.
- Wloga, D., K. Rogowski, N. Sharma, J. Van Dijk, C. Janke, B. Edde, M. H. Bre, N. Levilliers, V. Redeker, J. Duan, M. A. Gorovsky, M. Jerka-Dziadosz and J. Gaertig (2008). *Glutamylation on alpha-tubulin is not essential but affects the assembly and functions of a subset of microtubules in Tetrahymena thermophila.* Eukaryot Cell **7**(8): 1362-72.
- Woehlke, G. and M. Schliwa (2000). *Walking on two heads: the many talents of kinesin.* Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 50-8.
- Wolff, A., B. de Nechaud, D. Chillet, H. Mazarguil, E. Desbruyeres, S. Audebert, B. Edde, F. Gros and P. Denoulet (1992). *Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335.* Eur J Cell Biol **59**(2): 425-32.
- Wolff, A., M. Houdayer, D. Chillet, B. de Nechaud and P. Denoulet (1994). *Structure of the polyglutamyl chain of tubulin: occurrence of alpha and gamma linkages between glutamyl units revealed by monoreactive polyclonal antibodies.* Biol Cell **81**(1): 11-6.
- Woods, C. M., J. Zhu, P. A. McQueney, D. Bollag and E. Lazarides (1995). *Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway.* Mol Med **1**(5): 506-26.
- Wooster, R. and B. L. Weber (2003). *Breast and ovarian cancer.* N Engl J Med **348**(23): 2339-47.
- Wu, D., A. Haruta and Q. Wei (2010). *GIPCI interacts with MyoGEF and promotes MDA-MB-231 breast cancer cell invasion.* J Biol Chem **285**(37): 28643-50.
- Wu, X., X. Xiang and J. A. Hammer, 3rd (2006). *Motor proteins at the microtubule plus-end.* Trends Cell Biol **16**(3): 135-43.
- Xie, H., M. Surka, J. Howard and W. S. Trimble (1999). *Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins.* Cell Motil Cytoskeleton **43**(1): 52-62.
- Xie, Y., J. P. Vessey, A. Konecna, R. Dahm, P. Macchi and M. A. Kiebler (2007). *The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology.* Curr Biol **17**(20): 1746-51.
- Xue, J., C. W. Tsang, W. P. Gai, C. S. Malladi, W. S. Trimble, J. A. Rostas and P. J. Robinson (2004). *Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals.* J Neurochem **91**(3): 579-90.
- Xue, J., X. Wang, C. S. Malladi, M. Kinoshita, P. J. Milburn, I. Lengyel, J. A. Rostas and P. J. Robinson (2000). *Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **275**(14): 10047-56.
- Yahara, I., F. Harada, S. Sekita, K. Yoshihira and S. Natori (1982). *Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro.* J Cell Biol **92**(1): 69-78.
- Yamamoto, K., H. Ichijo and S. J. Korsmeyer (1999). *BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M.* Mol Cell Biol **19**(12): 8469-78.
- Yarm, F., I. Sagot and D. Pellman (2001). *The social life of actin and microtubules: interaction versus cooperation.* Curr Opin Microbiol **4**(6): 696-702.
- Yee, K. W., A. Hagey, S. Verstovsek, J. Cortes, G. Garcia-Manero, S. M. O'Brien, S. Faderl, D. Thomas, W. Wierda, S. Kornblau, A. Ferrajoli, M. Albitar, E. McKeegan, D. R. Grimm, T.



- Mueller, R. R. Holley-Shanks, L. Sahelijo, G. B. Gordon, H. M. Kantarjian and F. J. Giles (2005). *Phase I study of ABT-751, a novel microtubule inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies*. Clin Cancer Res **11**(18): 6615-24.
- Yu, D., T. Jing, B. Liu, J. Yao, M. Tan, T. J. McDonnell and M. C. Hung (1998). *Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase*. Mol Cell **2**(5): 581-91.
- Yu, W., X. Ding, F. Chen, M. Liu, S. Shen, X. Gu and L. Yu (2009). *The phosphorylation of SEPT2 on Ser218 by casein kinase 2 is important to hepatoma carcinoma cell proliferation*. Mol Cell Biochem **325**(1-2): 61-7.
- Yusuf, R. Z., Z. Duan, D. E. Lamendola, R. T. Penson and M. V. Seiden (2003). *Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation*. Curr Cancer Drug Targets **3**(1): 1-19.
- Yvon, A. M. and P. Wadsworth (1997). *Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells*. J Cell Sci **110** ( Pt 19): 2391-401.
- Yvon, A. M., P. Wadsworth and M. A. Jordan (1999). *Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells*. Mol Biol Cell **10**(4): 947-59.
- Zaffaroni, N., M. Pennati, G. Colella, P. Perego, R. Supino, L. Gatti, S. Pilotti, F. Zunino and M. G. Daidone (2002). *Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer*. Cell Mol Life Sci **59**(8): 1406-12.
- Zent, E., I. Vetter and A. Wittinghofer (2011). *Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation*. Biol Chem **392**(8-9): 791-7.
- Zhai, Y., P. J. Kronebusch, P. M. Simon and G. G. Borisy (1996). *Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis*. J Cell Biol **135**(1): 201-14.
- Zhang, C. C., J. M. Yang, E. White, M. Murphy, A. Levine and W. N. Hait (1998). *The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells*. Oncogene **16**(12): 1617-24.
- Zhang, J., C. Kong, H. Xie, P. S. McPherson, S. Grinstein and W. S. Trimble (1999). *Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP*. Curr Biol **9**(24): 1458-67.
- Zheng, D., A. Frankish, R. Baertsch, P. Kapranov, A. Reymond, S. W. Choo, Y. Lu, F. Denoeud, S. E. Antonarakis, M. Snyder, Y. Ruan, C. L. Wei, T. R. Gingeras, R. Guigo, J. Harrow and M. B. Gerstein (2007). *Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus annotation, analysis of transcription, and evolution*. Genome Res **17**(6): 839-51.
- Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts and T. Mitchison (1995). *Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex*. Nature **378**(6557): 578-83.
- Zhou, J. and P. Giannakakou (2005). *Targeting microtubules for cancer chemotherapy*. Curr Med Chem Anticancer Agents **5**(1): 65-71.
- Zhu, M., F. Wang, F. Yan, P. Y. Yao, J. Du, X. Gao, X. Wang, Q. Wu, T. Ward, J. Li, S. Kioko, R. Hu, W. Xie, X. Ding and X. Yao (2008). *Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization*. J Biol Chem **283**(27): 18916-25.

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1 : Article paru dans Proteomics

Annexe 2 : Protéines identifiées dans le protéome péri-microtubulaire des cellules Tv et T8



**ANNEXE 1 : ARTICLE PARU DANS PROTEOMICS**

**MODULATION OF SEPTIN AND MOLECULAR MOTOR RECRUITMENT IN THE  
MICROTUBULE ENVIRONMENT OF THE TAXOL-RESISTANT HUMAN BREAST  
CANCER CELL LINE MDA-MB-231**



## ANNEXE 2 : PROTEINES IDENTIFIEES DANS LE PROTEOME PERI-MICROTUBULAIRE DES CELLULES TV ET T8

Spot number <sup>(a)</sup>	Protein name	Biological process	Accession number in UniProtKB/Swiss-Prot	Theoretical M <sub>r</sub> /pI	Experimental M <sub>r</sub> /pI	Mascot score	Number of peptides matched	Coverage sequence (%)	Gel identification	Peptide sequences <sup>(b)</sup>
1	Endoplasmic precursor	chaperone	P14625	92696/4.76	100000/4.70	222	34	34	pH 3-11	-
2	Heat shock protein HSP 90-alpha	chaperone	P07900	85006/4.94	85000/5.05	116	31	39	pH 3-11	-
2	Heat shock protein HSP 90-beta	chaperone	P08238	83554/4.97	85000/5.05	108	29	39	pH 3-11	-
3	Alpha-actinin-4	structural protein	Q43707	105245/5.27	98000/5.30	398	61	55	pH 3-11	-
4	Neutral alpha-glucosidase AB precursor	proteasome	Q14697	107263/5.74	100000/5.70	103	19	15	pH 3-11	-
6	Elongation factor 2	transcription/ translation	P13639	96246/9.41	110000/6.50	86	13	12	pH 3-11	-
7	Calreticulin precursor	chaperone	P27797	48283/4.29	66000/4.30	87	14	30	pH 3-11	-
9	<b>Tubulin alpha-1B chain</b>	structural protein	P68363	50804/4.94	56000/5.13	211	23	49	pH 3-11	-
9	<b>Tubulin alpha-1A chain</b>	structural protein	Q71U36	50788/4.94	56000/5.13	182	21	46	pH 3-11	-
9	<b>Tubulin alpha-1C chain</b>	structural protein	Q9BQE3	50548/4.96	56000/5.13	182	21	46	pH 3-11	-
9	<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	structural protein	P68366	50634/4.95	56000/5.13	139	18	36	pH 3-11	-
9	<b>Tubulin alpha-3C/D chain</b>	structural protein	Q13748	50612/4.97	56000/5.13	128	16	37	pH 3-11	-
9	<b>Tubulin alpha-8 chain</b>	structural protein	Q9NY65	50746/4.94	56000/5.13	70	11	26	pH 3-11	-
10	Heat shock cognate 71 kDa protein	chaperone	P11142	71082/5.37	69000/5.30	135	29	40	pH 3-11	-
11	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	chaperone	P38646	73920/5.87	73000/5.50	260	39	45	pH 3-11	-
12	Heat shock 70 kDa protein 1	chaperone	P08107	70294/5.48	71000/5.45	169	22	32	pH 3-11	-
12	Heat shock 70 kDa protein 1L	chaperone	P34931	70730/5.76	71000/5.45	106	17	25	pH 3-11	-
12	Heat shock 70 kDa protein 6	chaperone	P17066	71440/5.81	71000/5.45	68	13	21	pH 3-11	-
13	Plastin-3	structural protein	P13797	70904/5.52	66000/5.55	149	30	37	pH 3-11	-
14	Ezrin	structural protein	P15311	69484/5.94	82000/6.00	157	29	36	pH 3-11	-
15	Moesin	structural protein	P26038	67892/6.08	77000/6.10	168	35	47	pH 3-11	-
16	Moesin	structural protein	P26038	67892/6.08	77000/6.20	281	44	49	pH 3-11	-
19	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	metabolism	P49915	77408/6.42	75000/6.40	90	20	31	pH 3-11	-
20	Far upstream element-binding protein 1	growth/ differentiation/ mitosis	Q96AE4	67690/7.18	75000/6.50	151	29	46	pH 3-11	-
21	Far upstream element-binding protein 1	growth/ differentiation/ mitosis	Q96AE4	67690/7.18	75000/6.70	146	28	36	pH 3-11	-

22	Transketolase	metabolism	P29401	68519/7.58	71000/7.50	131	26	37	pH 3-11	-
23	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	metabolism	Q9BWB5	58470/7.96	59000/6.60	157	26	47	pH 3-11	-
24	T-complex protein 1 subunit epsilon	chaperone	P48643	60089/5.45	60000/5.40	160	30	40	pH 3-11	-
25	T-complex protein 1 subunit theta	chaperone	P50990	60153/5.42	59000/5.50	221	26	47	pH 3-11	-
26	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	chaperone	P30101	57146/5.98	58000/5.60	133	26	43	pH 3-11	-
27	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	chaperone	P30101	57146/5.98	58000/5.70	133	25	37	pH 3-11	-
28	26S protease regulatory subunit 4	proteasome	P62191	49325/5.87	59000/5.80	165	25	49	pH 3-11	-
30	T-complex protein 1 subunit gamma	chaperone	P49368	61066/6.10	66000/6.05	91	24	39	pH 3-11	-
31	Stress-induced-phosphoprotein 1	chaperone	P31948	63227/6.40	64000/6.30	108	30	43	pH 3-11	-
32	EH domain-containing protein 1	signaling	Q9H4M9	60646/6.35	63000/6.40	169	30	44	pH 3-11	-
33	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transcription/ translation	P54577	59448/6.61	59000/6.60	198	31	54	pH 3-11	-
34	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	metabolism	P43490	55772/6.69	57000/6.70	162	17	38	pH 3-11	-
35	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	transcription/ translation	P52597	45985/5.38	47000/5.25	133	24	46	pH 3-11	-
35	Eukaryotic initiation factor 4A-I	transcription/ translation	P60842	46353/5.32	47000/5.25	62	21	39	pH 3-11	-
36	Actin, cytoplasmic 1	structural protein	P60709	42052/5.29	41000/5.30	142	17	41	pH 3-11	-
36	Actin, cytoplasmic 2	structural protein	P63261	42108/5.31	41000/5.30	142	17	41	pH 3-11	-
36	Actin, alpha cardiac muscle 1	structural protein	P68032	42334/5.23	41000/5.30	113	13	35	pH 3-11	-
36	Actin, alpha skeletal muscle	structural protein	P68133	42366/5.23	41000/5.30	113	13	35	pH 3-11	-
36	Actin, aortic smooth muscle	structural protein	P62736	42381/5.23	41000/5.30	101	12	32	pH 3-11	-
36	Actin, gamma-enteric smooth muscle	structural protein	P63267	42249/5.31	41000/5.30	101	12	32	pH 3-11	-
36	Protein beta-actin-like	structural protein	Q562R1	42318/5.39	41000/5.30	64	9	25	pH 3-11	-
37	Protein NDRG1	growth/ differentiation/ mitosis	Q92597	43264/5.49	44000/5.50	64	13	33	pH 3-11	-
38	Actin-related protein 3	structural protein	P61158	47797/5.61	50000/5.60	171	21	40	pH 3-11	-
39	T-complex protein 1 subunit beta	chaperone	P78371	57794/6.01	56000/6.00	191	30	59	pH 3-11	-
40	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	structural protein	Q99536	42122/5.88	45000/5.90	187	21	52	pH 3-11	-
41	Elongation factor 1-gamma	transcription/ translation	P26641	50429/6.25	47000/5.95	90	17	29	pH 3-11	-
41	Rab GDP dissociation inhibitor beta	signaling	P50395	51087/6.11	47000/5.95	64	14	29	pH 3-11	-
42	Elongation factor 1-gamma	transcription/ translation	P26641	50429/6.25	47000/6.30	95	14	35	pH 3-11	-
43	Elongation factor 1-gamma	transcription/ translation	P26641	50429/6.25	47000/6.30	126	19	34	both	-

43	<b>Septin-11</b>	growth/ differentiation/ mitosis	Q9NVA2	49652/6.36	47000/6.30	120	19	39	both	-
44	Alpha-enolase	metabolism	Q8WU71	47481/7.01	47000/6.40	129	20	46	pH 3-11	-
45	Elongation factor 1-alpha 1	transcription/ translation	P68104	50451/9.10	47000/9.00	69	17	39	pH 3-11	-
45	Elongation factor 1-alpha-like 3	transcription/ translation	Q5VTE0	50495/9.15	47000/9.00	67	17	39	pH 3-11	-
46	Fructose-bisphosphate aldolase A	metabolism	P04075	39851/8.30	39000/8.30	81	14	37	pH 3-11	-
47	Fructose-bisphosphate aldolase A	metabolism	P04075	39851/8.30	39000/8.40	93	16	55	pH 3-11	-
48	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolism	P04406	36201/8.57	36000/8.30	140	20	50	pH 3-11	-
49	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolism	P04406	36201/8.57	36000/8.40	165	23	60	pH 3-11	-
50	L-lactate dehydrogenase A chain	metabolism	P00338	36950/8.44	34500/8.40	158	19	53	pH 3-11	-
52	Poly(rC)-binding protein 1	transcription/ translation	Q15365	37987/6.66	40000/6.50	109	16	49	pH 3-11	-
53	Sialic acid synthase	metabolism	Q9NR45	40738/6.29	39000/6.40	119	17	40	pH 3-11	-
54	<b>Septin-2</b>	growth/ differentiation/ mitosis	Q15019	41689/6.15	41000/6.10	104	19	52	both	-
55	Macrophage-capping protein	structural protein	P40121	38779/5.88	41000/5.67	171	20	49	both	-
56	Macrophage-capping protein	structural protein	P40121	38779/5.88	41000/5.67	62	11	27	pH 3-11	-
57	LIM and SH3 domain protein 1	structural protein	Q14847	30097/6.61	37000/6.00	115	13	45	pH 3-11	-
58	Transaldolase	metabolism	P37837	37688/6.36	35000/5.70	107	18	46	pH 3-11	-
59	60S acidic ribosomal protein P0	transcription/ translation	P05388	34423/5.71	36000/5.60	140	16	50	pH 3-11	-
60	L-lactate dehydrogenase B chain	metabolism	P07195	36900/5.71	35000/5.60	127	17	39	both	-
61	F-actin-capping protein subunit alpha-1	structural protein	P52907	33073/5.45	36000/5.40	142	17	74	pH 3-11	-
63	Inorganic pyrophosphatase	metabolism	Q15181	33095/5.54	34000/5.50	77	8	37	pH 3-11	-
64	Glyoxalase domain-containing protein 4	metabolism	Q9HC38	35170/5.40	33000/5.37	62	12	31	pH 3-11	-
65	Proteasome activator complex subunit 2	proteasome	Q9UL46	27515/5.44	27000/5.40	94	14	36	pH 3-11	-
66	N-terminal acetyltransferase complex ARD1 subunit homolog A	metabolism	P41227	26613/5.41	26000/5.40	89	13	41	pH 3-11	-
68	Elongation factor 1-delta	transcription/ translation	P29692	31217/4.90	33000/4.88	139	15	46	pH 3-11	-
69	Tropomyosin alpha-4 chain	structural protein	P67936	28619/4.67	27000/4.60	126	21	47	pH 3-11	-
69	Tropomyosin alpha-3 chain	structural protein	P06753	32856/4.68	27000/4.60	69	17	36	pH 3-11	-
70	14-3-3 protein epsilon	signaling	P62258	29326/4.63	26500/4.60	166	23	69	pH 3-11	-
71	Translationally-controlled tumor protein	signaling	P13693	19697/4.84	20000/4.80	81	11	48	pH 3-11	-



72	Glutathione S-transferase P	metabolism	P09211	23569/5.43	20000/5.50	98	10	51	pH 3-11	-
73	Proteasome activator complex subunit 1	proteasome	Q06323	28876/5.78	25500/5.60	88	14	50	pH 3-11	-
74	Proteasome subunit beta type-7 precursor	proteasome	Q99436	30288/7.57	25000/5.70	62	12	37	pH 3-11	-
76	Proteasome subunit alpha type-1	proteasome	P25786	29822/6.15	26500/6.15	118	14	44	pH 3-11	-
78	Phosphoglycerate mutase 1	metabolism	P18669	28900/6.67	25000/6.50	113	16	61	pH 3-11	-
79	Triosephosphate isomerase	metabolism	P60174	26938/6.45	24000/6.30	140	16	68	pH 3-11	-
80	Calcyclin-binding protein	proteasome	Q9HB71	26308/8.28	25500/7.90	74	10	64	pH 3-11	-
81	FK506-binding protein 3	growth/ differentiation/ mitosis	Q00688	25218/9.29	25000/9.00	73	12	47	pH 3-11	-
83	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	metabolism	P30086	21158/7.01	19000/7.40	126	14	59	pH 3-11	-
85	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	transcription/ translation	P63241	17049/5.08	17000/5.00	104	6	24	pH 3-11	K.NGFVVLK.G (49); R.LPEGDLGK.E (51); R.KNGFVVLK.G (51); R.EDLRLPEGDLGK.E (32); K.YEDICPSTHNMDVPNIK.R + Oxidation (M) (25); K.KYEDICPSTHNMDVPNIK.R + Oxidation (M) (50)
85	Glia maturation factor beta	growth/ differentiation/ mitosis	P60983	16874/5.19	17000/5.00	92	3	11	pH 3-11	K.LGFFH.- (28); K.LVQTAELTK.V (66); K.NKLVQTAELTK.V (63)
86	Stathmin	signaling	P16949	17292/5.76	17000/5.60	73	12	59	pH 3-11	-
88	Nucleoside diphosphate kinase A	growth/ differentiation/ mitosis	P15531	17309/5.83	18000/5.65	68	9	68	pH 3-11	-
91	Cofilin-1	structural protein	P23528	18719/8.22	17500/6.00	306	6	34	pH 3-11	K.NIILEEGK.E (39); K.VFNDMKVR.K + Oxidation (M) (55); K.MLPDKDCR.Y + Oxidation (M) (31); K.MIYASSKDAIK.K + Oxidation (M) (74); K.AVLFLCLSEDKK.N (57); K.HELQANCYEEVK.D (77)
93	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	chaperone	P62937	18229/7.68	16500/7.40	106	5	24	pH 3-11	K.HVVFVGK.V (26); K.TAENFR.A (27); K.GSCFHR.I (25); K.KITIADCGQLE.- (42); K.EGMNIVEAMER.F + 2 Oxidation (M) (62)
94	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	chaperone	P62937	18229/7.68	16500/7.40	142	16	24	pH 3-11	-
99	Galectin-1	growth/ differentiation/ mitosis	P09382	15048/5.34	16000/4.90	153	3	25	pH 3-11	R.VRGEVAPDAK.S (43); K.DGGAWGTEQR.E (57); R.FNAHGDAANTIVCNSK.D (-92)
102	Heat shock 70 kDa protein 4	chaperone	P34932	95096/5.18	105000/5.10	260	45	43	pH 3-11	-
104	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	growth/ differentiation/	P55072	89950/5.14	97000/5.20	262	42	50	pH 3-11	-

		mitosis								
105	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Heat shock 70 kDa protein 5)	chaperone	P11021	72402/5.07	80000/4.90	287	38	52	pH 3-11	-
106	<b>Kinesin-1 heavy chain</b>	signaling	P33176	110358/6.12	116000/6.10	421	13	14	pH 3-11	K.STLLFGQR.A (44); R.VKALESALK.E (42); K.TNLSVHEDK.N (26); K.ALESALKEAK.E (59); R.AAEMMASLLK.D + 2 Oxidation (M) (49); K.ELQTLHNL.R.K (57); K.TGAEGAVLDEAK.N (105); K.LITDLQDQNK.M (78); K.QAVEQQIQSHR.E (50); R.FRPLNESEVNR.G (47); R.LQAENDASKEEVK.E (59); R.GGGAFVQNSQPVAVR.G (80); K.SAEIDSDDTGGSAQK.Q (123)
107	Protein disulfide-isomerase precursor	structural protein	P07237	57480/4.76	60000/4.65	208	33	55	pH 3-11	-
109	Ribonuclease inhibitor	signaling	P13489	51766/4.71	52000/4.65	145	18	43	pH 3-11	-
110	40S ribosomal protein SA	structural protein	Q86VC0	32947/4.79	45000/4.70	141	15	47	pH 3-11	-
111	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	transcription/ translation	Q96HM4	33707/4.95	40000/4.85	113	15	38	pH 3-11	-
112	Nucleophosmin	structural protein	Q96EA5	32726/4.64	38000/4.75	105	16	38	pH 3-11	-
113	Clathrin light chain A	structural protein	P09496	27174/4.43	34000/4.50	78	8	22	pH 3-11	-
114	Annexin A5	signaling	P08758	35971/4.94	34000/4.80	304	30	75	pH 3-11	-
115	Elongation factor 1-beta	transcription/ translation	P24534	24919/4.50	32000/4.50	143	12	30	pH 3-11	-
118	Chloride intracellular channel protein 1	signaling	O00299	27248/5.09	32000/5.10	141	11	48	pH 3-11	-
120	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	signaling	P52565	23250/5.02	29500/4.90	221	22	50	pH 3-11	-
121	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	signaling	P52566	23031/5.10	26000/5.05	121	11	35	pH 3-11	-
125	Moesin	structural protein	P26038	67892/6.08	77000/6.20	160	35	51	pH 3-11	-
125	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	transcription/ translation	P12956	70084/6.23	70000/6.20	88	17	36	pH 3-11	-
126	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	metabolism	P49915	77408/6.42	75000/6.40	62	17	35	pH 3-11	-
127	Clathrin heavy chain 1	structural protein	Q00610	193260/5.48	140000/5.60	165	6	3	pH 3-11	R.AVNYSFSK.V (42); K.VANVELYYR.A (65); K.VDKLDASESLR.K (74); K.IYIDSNNNPER.F (82); K.NNRPSGGLQTR.L (26); R.RPISADSAIMNPASK.V + Oxidation (M) (38)
129	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	proteasome	P22314	118858/5.49	116000/5.55	127	3	3	pH 3-11	R.KPLLESGTLGK.G (72); R.AENYDIPSAHR.H (61); R.LDQPMTEIVSR.V + Oxidation (M) (62)

130	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	transcription/ translation	P13010	83222/5.55	90000/5.60	148	23	34	pH 3-11	-
131	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	transcription/ translation	P13010	83222/5.55	90000/5.65	69	20	28	pH 3-11	-
132	Gelsolin	structural protein	P06396	86043/5.90	95000/5.70	179	7	8	pH 3-11	R.AVEVLPK.A (32); R.TPITVVK.Q (21); K.KGGVASGFK.H (71); K.TASDFITK.M (42); K.TGAQELLR.V (68); K.HVVPNEVVVQR.L (79); K.DSQEEKTEALTSK.R (45)
132	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	transcription/ translation	P42224	87850/5.74	95000/5.70	73	4	5	pH 3-11	K.MYLMLDNK.R + 2 Oxidation (M) (46); K.VLFDKDVNER.N (44); K.YTYEHDPIK.N (48); K.EAPEPEMELDGPK.G + Oxidation (M) (42)
135	Cytoplasmic aconitate hydratase	transcription/ translation	P21399	98850/6.23	97000/6.35	95	22	23	pH 3-11	-
138	Plastin-2	structural protein	P13796	70815/5.20	66000/5.18	132	29	46	pH 3-11	-
139	Heat shock cognate 71 kDa protein	chaperone	P11142	71082/5.37	69000/5.30	143	29	39	pH 3-11	-
140	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	chaperone	P10809	61187/5.70	60000/5.30	136	22	43	pH 3-11	-
141	Spliceosome RNA helicase BAT1	transcription/ translation	Q13838	49416/5.44	57000/5.50	127	19	41	pH 3-11	-
142	Glutathione synthetase	metabolism	P48637	52523/5.67	50000/5.60	126	15	34	pH 3-11	-
144	Cytosolic non-specific dipeptidase	metabolism	Q96KP4	53187/5.66	56000/5.70	94	13	27	pH 3-11	-
146	T-complex protein 1 subunit alpha	chaperone	P17987	60819/5.80	63000/5.80	67	16	25	pH 3-11	-
147	Leukotriene A-4 hydrolase	metabolism	P09960	69868/5.80	66000/5.80	152	24	35	pH 3-11	-
148	Moesin	structural protein	P26038	67892/6.08	77000/6.20	68	18	30	pH 3-11	-
149	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transcription/ translation	O43776	63758/5.90	66000/5.90	96	15	29	pH 3-11	-
150	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	metabolism	Q16222	59131/5.92	58000/5.90	151	21	33	pH 3-11	-
152	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	metabolism	P11413	59675/6.39	56000/6.40	169	20	44	both	-
154	Creatine kinase B-type	signaling	P12277	42902/5.34	42000/5.50	63	16	46	both	-
158	Proliferation-associated protein 2G4	growth/ differentiation/ mitosis	Q9UQ80	44101/6.13	45000/6.10	98	20	43	pH 3-11	-

159	Malate dehydrogenase	metabolism	P40925	36631/6.91	46000/6.25	201	11	25	pH 3-11	K.AQIALK.L (30); K.SAPSIPK.E (32); R.AKAQIALK.L (42); K.EVGVYEALK.D (24); K.ENFSCCLR.L (41); K.SQGAALDKYAK.K (55); K.GEFVTTVQQR.G (67); K.IFKSQGAALDK.Y (60); K.FVEGLPINDFSR.E (60); K.SAPSIPKENFSCCLR.L (69); K.ELTEEKESAFEFLSSA.- (38)
168	Actin, cytoplasmic 1	structural protein	P60709	42052/5.29	40000/5.75	128	6	13	pH 3-11	K.IIAPPER.K (35); K.IIAPPERK.Y (23); R.DLTDYLMK.I + Oxidation (M) (42); R.GYSFTTTAER.E (75); K.EITALAPSTMK.I + Oxidation (M) (57); K.QEYDESGPSIVHR.K (59)
170	Transaldolase	metabolism	P37837	37688/6.36	35000/5.70	72	9	28	pH 3-11	-
172	Phosphoglycerate kinase 1	metabolism	P00558	44985/8.30	41000/8.10	75	13	35	pH 3-11	-
173	Annexin A2	signaling	P07355	38808/7.57	35000/6.40	109	3	9	pH 3-11	K.TPAQYDASELK.A (46); R.TNQELQEINR.V (63); K.SLYYYIQQDTK.G (67)
174	Malate dehydrogenase	metabolism	P40925	36631/6.91	46000/6.25	181	4	12	pH 3-11	K.LGVTANDVK.N (54); K.SQGAALDKYAK.K (63); K.GEFVTTVQQR.G (67); K.DVIATDKEDVAFK.D (84)
175	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolism	P04406	36201/8.57	36000/8.30	98	10	28	pH 3-11	-
177	Proteasome activator complex subunit 3	proteasome	P61289	29602/5.69	32000/5.65	170	20	55	pH 3-11	-
178	Purine nucleoside phosphorylase	metabolism	P00491	32325/6.45	32000/6.25	101	17	68	pH 3-11	-
179	High mobility group protein B1	transcription/ translation	P09429	25049/5.62	29000/6.00	63	10	39	pH 3-11	-
180	Phosphoglycerate mutase 1	metabolism	P18669	28900/6.67	25000/6.50	97	13	55	pH 3-11	-
181	Triosephosphate isomerase	metabolism	P60174	26938/6.45	24000/6.30	163	18	73	pH 3-11	-
182	GTP-binding nuclear protein Ran	metabolism	Q9CW17	24579/7.01	23700/6.90	116	13	41	pH 3-11	-
184	Peroxiredoxin-1	metabolism	Q06830	22324/8.27	22500/7.50	76	10	42	pH 3-11	-
188	Filamin-A	structural protein	P21333	283301/5.70	100000/5.85	187	4	2	pH 3-11	K.AEISFEDR.K (43); R.EAGAGGLAIAVEGPSK.A (99); K.VNQPASFAVSLNGAK.G (115); R.FVPAEMGHTVSVK.Y + Oxidation (M) (28)
188	Filamin-B	structural protein	Q9NRB5	280188/5.49	100000/5.85	101	3	1	pH 3-11	K.TATPEIVDNK.D (29); R.AGPGTLSVTIEGPSK.V (57); R.EAGAGGLSIAVEGPSK.A (74)
189	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	metabolism	P11586	102180/6.89	100000/6.80	159	31	34	pH 3-11	-

192	Syntaxin-binding protein 2	signaling	Q15833	66853/6.11	66000/6.15	188	14	19	pH 3-11	K.VTELLR.T (34); R.WTPVIK.D (30); R.FLDDLK.A (20); K.SVQALIK.D (34); K.DLSQILK.K (32); K.KVTELLR.T (45); K.DLSQILKK.M (36); R.SQLLIMDR.A + Oxidation (M) (41); R.NGVSEENLAK.L (53); R.MEPTYQLSR.W + Oxidation (M) (37); K.DVMEDAVEDR.L + Oxidation (M) (68); K.ADTPSLGEGPEK.T (64); K.DFQGTPTFTYK.A (31); R.NLEQLGGTVTNPGSGTSSR.L (74)
192	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transcription/ translation	P54136	76129/6.26	66000/6.15	82	6	9	pH 3-11	R.FPEILQK.I (35); K.SLTAEIDR.L (36); R.GFVQVDDGRK.I (40); R.LLQEEEEIK.S (59); K.HLPDNECIEK.V (25); R.LANIDEEMLQK.A + Oxidation (M) (51)
193	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (CRMP2)	growth/ differentiation/ mitosis	Q16555	62711/5.95	57000/5.50	74	10	20	pH 3-11	-
194	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	metabolism	Q9Y285	57585/7.31	57000/7.30	93	13	23	pH 3-11	-
195	T-complex protein 1 subunit eta	chaperone	Q99832	59842/7.55	59000/6.60	125	16	26	pH 3-11	-
196	DnaJ homolog subfamily C member 3	chaperone	Q13217	58000/5.83	57000/6.10	196	9	20	pH 3-11	R.AECFIK.E (29); K.FIDIAAAK.E (46); K.DEKPVEAIR.V (52); K.EVLSDPPEMR.K + Oxidation (M) (30); R.RATVFLAMGK.S + Oxidation (M) (55); K.LIESAEELIR.D (77); K.LDEAEDDFKK.V (53); K.TEPSIAEYTVR.S (48); K.LKNDNTEAFYK.I (42)
196	Pre-mRNA-processing factor 19	transcription/ translation	Q9UMS4	55603/6.14	57000/6.10	78	3	8	pH 3-11	K.FIASTGMDR.S + Oxidation (M) (40); K.SSEQILATLK.G (45); K.TLQLDNNFEVK.S (62)

197	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	metabolism	O43175	57356/6.29	56000/6.30	574	14	31	pH 3-11	K.TLGILGLGR.I (45); R.DLPLLLFR.T (42); K.FMGTELANGK.T + Oxidation (M) (37); K.QADVNLVNAK.L (56); R.GGIVDEGALLR.A (95); K.VTADVINAEEK.L (88); K.ILQDGGGLQVVEK.Q (93); K.GTIQVITQGTSLK.N (94); R.KILQDGGGLQVVEK.Q (84); K.VLISDSLDPCCR.K (59); R.AGTGVNDVDLEAATR.K (98); R.CGEEIAVQFVDMVK.G + Oxidation (M) (96); R.TQTSDPAMLPTMIGLLAEAGVR.L + 2 Oxidation (M) (94); R.ALQSGQCAGAALDVFTEEPPRDR.A (30)
197	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	metabolism	P11413	59675/6.39	56000/6.30	130	4	11	pH 3-11	K.LPDAYER.L (44); R.VQPNEAVYTK.M (32); R.GPTEADELMKR.V + Oxidation (M) (53); R.NSYVAGQYDDAASYQR.L (98)
198	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	metabolism	P12268	56226/6.44	56000/6.40	284	10	17	pH 3-11	R.DIDFLK.E (13); R.VRDVFEAK.A (43); K.EANEILQR.S (59); R.AMMYSGELK.F + 2 Oxidation (M) (30); R.YFSEADKIK.V (45); K.NLIDAGVDALR.V (70); K.VAQGVSGAVQDK.G (83); R.EDLVVAPAGITLK.E (46); K.REDLVVAPAGITLK.E (80); K.YEQGFITDPVVLSPK.D (91)
198	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	metabolism	P11413	59675/6.39	56000/6.40	198	11	14	pH 3-11	R.NELVIR.V (39); K.LPDAYER.L (48); K.QSEPFK.A (23); K.RNELVIR.V (35); R.LTVADIRK.Q (27); R.KQSEPFK.A (24); R.GPTEADELMK.R + Oxidation (M) (48); R.VQPNEAVYTK.M (28); R.GPTEADELMKR.V + Oxidation (M) (67); K.EMVQNLMLVLR.F + 2 Oxidation (M) (48); R.NSYVAGQYDDAASYQR.L (115)
199	<b>Tubulin beta chain</b>	structural protein	P07437	50095/4.78	53000/4.90	122	20	33	pH 3-11	-
199	<b>Tubulin beta-2C chain</b>	structural protein	P68371	50255/4.79	53000/4.90	110	19	29	pH 3-11	-
199	<b>Tubulin beta-3 chain</b>	structural protein	Q13509	50856/4.83	53000/4.90	99	18	29	pH 3-11	-
199	<b>Tubulin beta-2A chain</b>	structural protein	Q13885	50274/4.78	53000/4.90	89	17	27	pH 3-11	-
199	<b>Tubulin beta-2B chain</b>	structural protein	Q9BVA1	50377/4.78	53000/4.90	89	17	27	pH 3-11	-
199	<b>Tubulin beta-4 chain</b>	structural protein	P04350	50010/4.78	53000/4.90	76	16	22	pH 3-11	-
199	<b>Tubulin beta-6 chain</b>	structural protein	Q9BUF5	50281/4.77	53000/4.90	64	13	21	pH 3-11	-

200	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	metabolism	P14868	57499/6.11	56000/6.20	242	25	51	pH 3-11	-
201	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	transcription/ translation	P31943	49484/5.89	49000/5.30	129	5	10	pH 3-11	R.FIYTR.E (21); R.YIEIFK.S (23); R.VHIEIGPDGR.V (56); K.SNNVEMDWVLK.H + Oxidation (M) (41); K.HTGPNSPDTANDGFVR.L (94)
202	Fructose-bisphosphate aldolase	metabolism	P09972	39830/6.41	40000/6.30	121	19	68	pH 3-11	-
203	Poly(rC)-binding protein 1	transcription/ translation	Q15365	37987/6.66	40000/6.50	68	12	42	pH 3-11	-
204	Transaldolase	metabolism	P37837	37688/6.36	35000/5.70	159	5	17	pH 3-11	R.RLIELYK.E (25); K.TIVMGASFR.N + Oxidation (M) (60); K.LLGELLQDNAK.L (84); R.LSFDKAMDVAR.A + Oxidation (M) (34); K.ALAGCDFLTISP.K.L (82)
204	Annexin A1	signaling	P04083	38918/6.57	35000/5.70	147	5	16	pH 3-11	R.NALLSLAK.G (40); R.SEIDMNDIK.A + Oxidation (M) (17); K.TPAQFADDEL.R.A (72); K.GVDEATHIDILTK.R (92); R.SEDFGVNEDLADSDAR.A (42)
205	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	transcription/ translation	Q99729	36316/8.22	35000/7.30	155	7	21	pH 3-11	R.GFGFILFK.D (32); R.GFVFITFK.E (47); K.DLKDYFTK.F (31); K.FGEVVDCTIK.M (64); K.EVYQQQYQYGSGR.G (70); R.GFVFITFKKEEPVK.K (68); R.EYFGEFGEIEAIELPMDPK.L + Oxidation (M) (32)
205	Aldo-keto reductase family 1 member C3	metabolism	Q9UKL9	37220/8.05	35000/7.30	83	5	14	pH 3-11	R.TPALIALR.Y (65); K.LAIEAGFR.H (50); K.SIGVSNFNR.R (37); K.REDIFYTSK.L (25); R.QLEMILNKPLK.Y + Oxidation (M) (23)
206	14-3-3 protein zeta/delta	signaling	Q6P3U9	27899/4.73	28000/4.75	101	15	51	pH 3-11	-
207	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	transcription/ translation	Q7KZF4	102618/6.74	110000/6.35	372	14	16	pH 3-11	K.ELVLQR.E (37); R.QINLSNIR.A (28); R.TDAVDSVVR.D (69); R.RGEFCIAK.F (26); K.SLLSAEEAAK.Q (44); K.QFLPFLQR.A (31); R.EYGMIIYLKG.D + Oxidation (M) (36); R.LGTLSPAFSTR.V (50); K.MVLSGCIIIVR.G + Oxidation (M) (89); R.ADDADEFYYSR.- (55); R.DYVAPTANLDQK.D (65); K.VMQVLNADAIVVK.L + Oxidation (M) (82); R.SEAVVEYVFGSR.L (104); K.VITEYLNAQESAK.S (78)

207	Elongation factor 2	transcription/ translation	P13639	96246/9.41	110000/6.35	67	3	3	pH 3-11	R.GGGQIIPAR.R (24); K.QFAEMYVAK.F + Oxidation (M) (27); R.VFSGLVSTGLK.V (67)
207	Hexokinase-1	metabolism	P19367	103561/6.36	110000/6.35	44	4	5	pH 3-11	R.LALLQVR.A (30); K.MLPTFVR.S + Oxidation (M) (26); R.ITPELLTR.G (38); K.GAAMVTAVAYR.L + Oxidation (M) (41)
208	Filamin-B	structural protein	Q9NRB5	280188/5.49	100000/5.90	102	3	2	pH 3-11	K.VNQPASFAIR.L (34); R.AGPGTLSVTIEGPSK.V (68); R.DAGYGGISLAVEGSPK.V (67)
209	Protein transport protein Sec23A	structural protein	Q15436	87018/6.64	80000/6.30	209	9	12	pH 3-11	R.FPMPR.Y + Oxidation (M) (27); R.FLQPVQK.I (27); K.HFEALANR.A (38); K.MGFGGTLEIK.T + Oxidation (M) (65); R.AETEEGPDVLR.W (64); R.GPQVQQPPPSNR.F (37); K.ISGAIGPCVSLNSK.G (62); R.AVLNPLCQVDYR.A (71); R.GAIQFVTQYQHSSGQR.R (73)
209	Far upstream element-binding protein 2	transcription/ translation	Q92945	73443/6.84	80000/6.30	125	6	9	pH 3-11	K.DAFADAVQR.A (69); R.IGGGIDVPVPR.H (68); K.MMLDDIVSR.G + 2 Oxidation (M) (30); K.IAHIMGPPDR.C + Oxidation (M) (25); R.SVSLTGAPESVQK.A (54); R.SGPPGPPGGPMPPGGR.G + Oxidation (M) (31)
210	Cystathionine gamma-lyase	metabolism	P32929	45050/6.21	42000/6.10	103	3	5	pH 3-11	R.QVASEFGLK.I (50); R.DVLGISDTLIR.L (66); K.NDRDVLGISDTLIR.L (58)
211	Catalase	metabolism	P04040	59947/6.90	59000/6.60	342	11	25	pH 3-11	K.LNVITVGPR.G (81); K.NLSVEDAAR.L (40); K.DYPLIPVGK.L (24); R.DLFNAIATGK.Y (48); R.LCENIAGHLK.D (30); R.LSQEDPDYGIR.D (40); K.LVNANGEAVYCK.F (73); K.ADVLTGAGNPVGDK.L (105); R.FSTVAGESGSADTVR.D (74); R.FNTANDDNVTQVR.A (97); R.FSTVAGESGSADTVRDPR.G (45)
211	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	metabolism	Q9BWB5	58470/7.96	59000/6.60	139	6	13	pH 3-11	R.VNFAMNVGK.A + Oxidation (M) (54); K.GDYPLEAVR.M (48); R.GDLGIEIPA.EK.V (43); R.LDIDSPPIAR.N (64); R.NTGIICTIGPASR.S (66); K.GADFLVTEVENGGSLGSK.K (34)



211	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transcription/ translation	P54577	59448/6.61	59000/6.60	116	8	16	pH 3-11	K.IADFLK.A (22); K.IDVGEAEPR.T (68); K.EYTLDVYR.L (20); K.LASAAYPDPSK.Q (47); R.NLQEVLGEEK.L (37); K.KLASAAYPDPSK.Q (31); K.NSEPEEVIPSR.L (59); K.AMLESIGVPLEK.L + Oxidation (M) (45)
211	UDP-glucose 6-dehydrogenase	metabolism	O60701	55674/6.73	59000/6.60	103	3	9	pH 3-11	K.LAANAFLAQR.I (51); R.VTVVDVNESR.I (61); R.VLIGGDETPEGQR.A (48)
212	Malate dehydrogenase	metabolism	P40925	36631/6.91	46000/6.25	62	8	25	pH 3-11	-
213	Annexin A2	signaling	P07355	38808/7.57	35000/6.40	176	7	23	pH 3-11	K.LMVALAK.G + Oxidation (M) (50); K.AYTNFDAER.D (57); R.DALNIETAIK.T (59); R.QDIAFAYQR.R (51); K.TPAQYDASELK.A (41); R.TNQELQEINR.V (65); K.SLYYYIQQDTK.G (58)
213	Malate dehydrogenase	metabolism	P40925	36631/6.91	35000/6.40	134	5	10	pH 3-11	R.LAADDFR.L (43); R.VLDELTLTK.A (40); R.SLLEGGSSGGGGR.G (49); R.ALEESNYELEGK.I (80); R.SQYEQLAEQNRK.D (33)
213	Putative quinone oxidoreductase	metabolism	Q53FA7	35685/6.67	35000/6.40	121	4	12	pH 3-11	R.LLPVLDR.I (22); R.GSLITSLLR.S (63); K.LGAAAGFNYK.K (46); R.MAGAIPLVTAGSQK.K + Oxidation (M) (81)
214	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	metabolism	O15067	146226/5.50	120000/5.47	80	15	10	pH 4-7	-
215	Importin subunit beta-1	signaling	Q14974	98420/4.68	95000/4.65	316	16	21	pH 4-7	R.VAAGLQIK.N (49); R.LELEAAQK.F (36); R.VAALQNLVK.I (45); K.TTLVIMER.L + Oxidation (M) (38); K.DCYPVQK.T (25); R.WLAIDANAR.R (40); K.NSLTSKDPDIK.A (41); R.VLANPGNSQVAR.V (87); R.SSAYESLMEIVK.N + Oxidation (M) (62); K.SNEILTAIQGMK.K + Oxidation (M) (70); K.LAATNALLNSLEFTK.A (95); K.YMEAFKPFLLGIGLK.N + Oxidation (M) (42); K.SDYDMVDYLNELR.E + Oxidation (M) (37); K.LVEARPMIHELLTEGR.R + Oxidation (M) (24); R.LQQVLQMESHQSTSDR.I + Oxidation (M) (43); K.VQHQDALQISDVVMASLLR.M + Oxidation (M) (53)

215	Heat shock protein HSP 90-alpha	chaperone	P07900	85006/4.94	95000/4.65	144	5	7	pH 4-7	K.YIDQEELNK.T (51); K.HIYYITGETK.D (37); K.DQVANSFAFVER.L (65); K.ADLINNLGTIAK.S (52); K.EDQTEYLEER.R (63)
216	Heat shock protein HSP 90-alpha	chaperone	P07900	85006/4.94	85000/5.05	248	9	13	pH 4-7	R.ALLFVPR.R (27); K.YIDQEELNK.T (51); K.DQVANSFAFVER.L (58); K.ADLINNLGTIAK.S (62); R.RAPFDLFENR.K (47); R.ELISNSSDALDK.I (74); K.EDQTEYLEER.R (62); R.TLTIVDTGIGMTK.A + Oxidation (M) (93); K.EGLELPEDEEEK.K (21)
216	Heat shock protein HSP 90-beta	chaperone	P08238	83554/4.97	85000/5.05	170	7	10	pH 4-7	R.ALLFIPR.R (29); K.YIDQEELNK.T (51); R.RAPFDLFENK.K (28); K.ADLINNLGTIAK.S (62); K.EDQTEYLEER.R (62); R.TLTIVDTGIGMTK.A + Oxidation (M) (93); K.EGLELPEDEEEK.K (21)
217	Flavin reductase	metabolism	P30043	22219/7.13	23500/7.40	254	5	42	pH 3-11	R.LQAVTDDHIR.M (63); R.NDLSPTTVMSEGAR.N + Oxidation (M) (74); K.TVAGQDAVIVLLGTR.N (83); R.LPSEGPRPAHV VVGDVLAADVDK.T (87); K.YVAVMPPHIGDQPLTGAYTVTLTLDGR.G + Oxidation (M) (81)
218	Plastin-2	structural protein	P13796	70815/5.20	66000/5.18	272	14	25	pH 4-7	R.VNKPPYPK.L (26); K.LSPEELLR.W (36); K.AACLPLPGYR.V (34); R.QFVTATDVVR.G (65); R.EGESLEDLMK.L + Oxidation (M) (42); K.SSSISSFKDPK.I (27); R.NWMNSLGVNPR.V + Oxidation (M) (55); K.IGNFSTDIKDSK.A (59); R.GSVSDEEMMELR.E + 2 Oxidation (M) (52); K.AYYHILLEQVAPK.G (36); K.MVMTVFACLMGK.G + 3 Oxidation (M) (50); K.MINLSVPDTIDER.T + Oxidation (M) (56); R.VYALPEDLVEVNP.M (69); K.FSLVGIGGQDLNEGNR.T (85)
218	Plastin-3	structural protein	P13797	70904/5.52	66000/5.18	58	4	6	pH 4-7	K.VNKPPYPK.L (26); K.LSPEELLR.W (36); R.QFVTPADV VSGNPK.L (20); K.MINLSVPDTIDER.A + Oxidation (M) (56)
218	Plastin-1	structural protein	Q14651	70707/5.33	66000/5.18	53	3	5	pH 4-7	K.LSPEELLR.W (36); K.MVMTVFACLMGK.G + 3 Oxidation (M) (50); K.QFVTPADV VSGNPK.L (20)
219	Heterogeneous nuclear	transcription/	P61978	51230/5.39	60000/5.07	89	14	24	pH 4-7	-

	ribonucleoprotein K	translation								
220	Insulin-degrading enzyme	signaling	P14735	118692/6.16	110000/5.80	116	7	7	pH 3-11	K.LFSEVENK.N (38); K.EATPYPALIK.D (25); K.EALDDVTLPR.L (58); K.QDDKFFLPK.A (25); R.VEAFITMEK.S + Oxidation (M) (47); K.VLLISDPTTDK.S (59); R.ESLDDLTNLVVK.L (48)
220	Catenin alpha-1	structural protein	P35221	100693/5.95	110000/5.80	91	3	3	pH 3-11	R.SDALNSAIDK.M (24); R.AIMAQLPQEQK.A + Oxidation (M) (61); R.NAGNEQDLGIQYK.A (61)
221	<b>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1</b>	structural protein	Q9Y6G9	56829/6.01	57000/5.98	61	9	18	pH 4-7	-
222	<b>Tubulin alpha-1B chain</b>	structural protein	P68363	50804/4.94	55000/5.03	461	15	41	pH 4-7	R.LSVDYGK.K (34); K.FDLMYAK.R + Oxidation (M) (34); R.LSVDYGKK.S (35); K.DVNAAIATIK.T (67); K.EIIDLVLDL.I (60); K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) (49); R.LDHKFDLMYAK.R + Oxidation (M) (48); R.SIQFVDWCPTGFK.V (64); R.NLDIERPTYTNLNR.L (33); R.IHFPLATYAPVISA.EK.A (67); K.VGINYQPPTVVPGLAK.V (27); R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L + Oxidation (M) (99); K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H (111); K.DYEEVGVDSEGEDEGEY.- (96); R.QLFHPEQLITGKEDAANNYAR.G (56)
222	<b>Tubulin alpha-1C chain</b>	structural protein	Q9BQE3	50548/4.96	55000/5.03	382	13	34	pH 4-7	R.LSVDYGK.K (34); K.FDLMYAK.R + Oxidation (M) (34); R.LSVDYGKK.S (35); K.DVNAAIATIK.T (67); K.EIIDLVLDL.I (60); K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) (49); R.LDHKFDLMYAK.R + Oxidation (M) (48); R.NLDIERPTYTNLNR.L (33); R.IHFPLATYAPVISA.EK.A (67); K.VGINYQPPTVVPGLAK.V (27); K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H (111); K.DYEEVGADSEGEDEGEY.- (119); R.QLFHPEQLITGKEDAANNYAR.G (56)

222	<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	structural protein	P68366	50634/4.95	55000/5.03	338	14	36	pH 4-7	R.LSVDYGK.K (34); K.FDLMYAK.R + Oxidation (M) (34); R.LSVDYGKK.S (35); K.DVNAIAAIK.T (81); K.EIIDPVLD.R.I (54); K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) (49); R.LDHKFDLMYAK.R + Oxidation (M) (48); R.SIQFVDWCPTGFK.V (64); R.AVFVDLEPTVIDEIR.N (57); R.NLDIERPTYTNLNR.L (33); R.IHFPLATYAPVISA.EK.A (67); K.VGINYQPPTVVPGDLAK.V (27); R.AVCMLSNTTAAIAEAWAR.L + Oxidation (M) (99); R.QLFHPEQLITGKEDAANNYAR.G (56)
223	<b>Tubulin alpha-1B chain</b>	structural protein	P68363	50804/4.94	55000/5.05	432	15	37	pH 4-7	R.LSVDYGK.K (28); K.FDLMYAK.R + Oxidation (M) (37); R.LSVDYGKK.S (30); K.DVNAIAIATIK.T (81); K.EIIDLVLD.R.I (56); K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) (48); R.LDHKFDLMYAK.R + Oxidation (M) (37); R.QLFHPEQLITGK.E (40); R.LISQIVSSITASLR.F (70); R.SIQFVDWCPTGFK.V (20); R.AVFVDLEPTVIDEVR.T (60); R.NLDIERPTYTNLNR.L (36); R.IHFPLATYAPVISA.EK.A (56); K.VGINYQPPTVVPGDLAK.V (26); K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H (128)
223	<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	structural protein	P68366	50634/4.95	55000/5.05	223	12	29	pH 4-7	R.LSVDYGK.K (28); K.FDLMYAK.R + Oxidation (M) (37); R.LSVDYGKK.S (30); K.EIIDPVLD.R.I (33); K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) (48); R.LDHKFDLMYAK.R + Oxidation (M) (37); R.QLFHPEQLITGK.E (40); R.LISQIVSSITASLR.F (70); R.SIQFVDWCPTGFK.V (20); R.NLDIERPTYTNLNR.L (36); R.IHFPLATYAPVISA.EK.A (56); K.VGINYQPPTVVPGDLAK.V (26)
223	<b>Tubulin alpha-8 chain</b>	structural protein	Q9NY65	50746/4.94	55000/5.05	143	6	18	pH 4-7	K.FDLMYAK.R + Oxidation (M) (37); R.LDHKFDLMYAK.R + Oxidation (M) (37); R.QLFHPEQLITGK.E (40); R.LISQIVSSITASLR.F (70); R.NLDIERPTYTNLNR.L (36); K.VGINYQPPTVVPGDLAK.V (26)

224	AH receptor-interacting protein	signaling	O00170	38096/6.09	36000/6.05	95	4	18	pH 3-11	R.GKPMELIIGK.K + Oxidation (M) (49); K.HVVLYPLVAK.S (56); K.AVPLIHQEGNR.L (56); K.VLELDPALAPVVS.R (33)
226	FK506-binding protein 4	signaling	Q02790	52057/5.35	57000/5.50	110	8	21	pH 4-7	K.LEQSTIVK.E (24); K.DKFSFDLGG.G (29); K.LYANMFER.L + Oxidation (M) (59); K.VLQLYPNNK.A (38); K.TQLAVCQQR.I (33); K.ALELDSNNEK.G (55); R.EGTGTEMPMIGDR.V + 2 Oxidation (M) (41); K.ATESGAQSAPLMEGVDISPK.Q + Oxidation (M) (49)
227	Sorting nexin-4	signaling	O95219	52161/5.69	56000/5.72	146	18	32	pH 4-7	-
229	Xaa-Pro dipeptidase	metabolism	P12955	55311/5.64	56000/5.67	99	15	43	pH 4-7	-
231	Fascin	structural protein	Q16658	55123/6.84	55000/6.20	66	10	22	pH 3-11	-
232	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	transcription/ translation	P31943	49484/5.89	49000/5.30	88	11	24	pH 4-7	-
234	Gamma-enolase	metabolism	P09104	47581/4.91	49000/4.77	347	6	18	pH 4-7	R.LGAEVYHTLK.G (54); R.IEEELGDEAR.F (78); R.GNPTVEVDLYTAK.G (73); K.IVIGMDVAASEFYR.D + Oxidation (M) (101); K.LDNLMLELDGTENK.S + Oxidation (M) (81); R.AAVPSGASTGIYEALELR.D (113)
235	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	transcription/ translation	P52597	45985/5.38	47000/5.25	227	6	16	pH 4-7	R.YIGIVK.Q (23); R.YIEVFK.S (27); R.RYIGIVK.Q (29); R.VHIEIGPDGR.V (59); K.HSGPNSADSANDGFVR.L (105); R.QSGEAFVELGSEDDVK.M (78)
236	Hsp70-binding protein 1	chaperone	Q9NZL4	40190/5.13	42000/5.1	152	3	8	pH 4-7	R.YLEAGAAGLR.W (92); R.LDGFVLMR.A + Oxidation (M) (51); R.EQEAGLLQFLR.L (79)
236	Protein arginine N-methyltransferase 1	transcription/ translation	Q9NZ06	42059/5.24	42000/5.1	124	4	9	pH 4-7	K.EPLVDVVDPK.Q (40); K.VEEVELPVEK.V (42); R.ATLYVTAIEDR.Q (84); K.GKVEEVELPVEK.V (61)
236	Actin, aortic smooth muscle	structural protein	P62736	42381/5.23	42000/5.1	91	6	18	pH 4-7	R.LDLAGR.D (29); K.AGFAGDDAPR.A (70); R.DLTDYLMK.I + Oxidation (M) (37); K.EITALAPSTMK.I + Oxidation (M) (46); K.QEYDESGPSIVHR.K (44); K.SYELPDGQVITIGNER.F (30)
238	Leukocyte elastase inhibitor	signaling	P30740	42829/5.90	41000/5.90	122	16	40	pH 4-7	-
239	Serpin B6	signaling	P35237	42936/5.18	41000/5.20	78	10	28	pH 4-7	-

240	Macrophage-capping protein	structural protein	P40121	38779/5.88	41000/5.67	166	6	19	pH 4-7	R.DLALAIR.D (41); K.ANAQAAAALYK.V (60); K.VSDATGQMNLTK.V + Oxidation (M) (74); K.EGNPEEDLTADK.A (49); K.YQEGGVESAFHK.T (42); R.MQYAPNTQVEILPQGR.E + Oxidation (M) (61)
241	Autophagy-related protein 3	signaling	Q9NT62	36298/4.66	40000/4.72	76	3	8	pH 4-7	K.QFLVTK.N (20); K.TDAGGEDAILQTR.T (76); K.AKTDAGGEDAILQTR.T (20)
242	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	proteasome	Q9Y2Z0	41284/5.07	40000/4.93	327	9	25	pH 4-7	K.LEGDAALNR.L (50); K.LPSGEDYNLK.L (48); K.LEGQGDVPTPK.Q (76); K.NDVNVEFSEK.E (76); K.NLYPSSSPYTR.N (38); K.NYAAALETFTGQK.L (102); K.SLELNPNNSTAMLR.K + Oxidation (M) (68); R.LFQQIYSDGSDEVK.R (85); R.LFQQIYSDGSDEVKR.A (54)
243	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	metabolism	O94760	31444/5.53	37000/5.45	99	10	34	pH 4-7	-
244	L-lactate dehydrogenase B chain	metabolism	P07195	36900/5.71	35000/5.60	99	11	36	pH 4-7	-
245	Spermidine synthase	metabolism	P19623	34373/5.30	32500/5.10	116	3	13	pH 4-7	R.YQDILVFR.S (41); K.VLIIGGGDGGVLR.E (63); K.FLPGMAIGYSSSK.L + Oxidation (M) (77)
246	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	transcription/ translation	Q9UNP9	33695/5.41	33000/5.37	249	8	25	pH 4-7	R.IQMLLR.S + Oxidation (M) (22); R.VNLAKPMR.I + Oxidation (M) (41); K.FDDENFILK.H (48); R.SNPQVYMDIK.I + Oxidation (M) (58); K.KFDDENFILK.H (61); R.SDVVPMTAENFR.C + Oxidation (M) (64); R.VLYVGGLAEEVDDK.V (112); K.TLEENKEEEGSEPPK.A (60)
246	Chloride intracellular channel protein 4	signaling	Q9Y696	28982/5.45	33000/5.37	159	6	24	pH 4-7	K.FSAYIK.N (34); R.YLTNAYS.R.D (46); K.GVVFSVTTVDLK.R (81); R.DEFTNTCPSDK.E (45); K.NSRPEANEALER.G (61); K.HPESNTAGMDIFAK.F + Oxidation (M) (57)
246	Glyoxalase domain-containing protein 4	metabolism	Q9HC38	35170/5.40	33000/5.37	120	5	15	pH 4-7	K.FYLQNR.S (23); R.IAFSPPQK.E (38); K.GGVDHAAAFGR.I (64); K.LLDDAMAADK.S + Oxidation (M) (64); K.ILTPLVSLDTPGK.A (61)
251	Peroxiredoxin-6	metabolism	P30041	25133/6.00	25000/5.90	81	5	19	pH 4-7	K.LAPEFAK.R (31); R.NFDEILR.V (39); R.VVVFVGPDK.K (44); K.LPFPIDDR.N (59); R.VVVFVGPDKK.L (41)

256	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	growth/ differentiation/ mitosis	P61088	17184/6.13	15700/5.82	121	5	33	pH 4-7	R.LYAMNNI.- + Oxidation (M) (37); K.IYHPNVDK.L (45); R.LLAEPVPGIK.A (51); K.TNEAQAIETAR.A (83); K.LELFLPEEYPMAAPK.V + Oxidation (M) (43)
257	Coactosin-like protein	structural protein	Q14019	16049/5.54	15500/5.25	84	9	51	pH 4-7	-
258	14 kDa phosphohistidine phosphatase	signaling	Q9NRX4	13995/5.65	14700/5.42	170	4	32	pH 4-7	-
259	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	signaling	O75368	12766/5.22	14400/5.25	98	8	72	pH 4-7	-
260	Thioredoxin domain-containing protein 17	signaling	Q9BRA2	14217/5.40	14400/5.25	216	4	38	pH 4-7	K.VTAVPTLLK.Y (33); K.TIFAYFTGSK.D (67); K.SWCPDCVQAEPVVR.E (85); R.YEEVSVSGFEFHR.A (83)
260	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	signaling	O75368	12766/5.22	14400/5.25	142	4	46	pH 4-7	R.GDYDAFFEAR.E (60); R.VYIASSSGSTAIK.K (82); K.QQDVLGFLEANK.I (40); R.ENNAVYAFLGLTAPPGSK.E (63)
261	Bifunctional protein NCOAT	transcription/ translation	O60502	103932/4.82	116000/4.77	115	6	6	pH 4-7	R.LFLGPK.G (28); R.ILEFYK.L (31); R.ANSSVSVNCK.G (61); K.VYTIRPYFPK.D (41); K.EIPVESIEEVSK.I (77); K.KQPDEEPMDMVVEK.Q + 2 Oxidation (M) (20)
262	Major vault protein	signaling	Q14764	99551/5.34	97000/5.25	241	36	44	pH 4-7	-
263	Cdc42-interacting protein 4	signaling	Q96RJ1	68538/5.55	75000/5.18	153	7	12	pH 4-7	R.LKLEVQK.Y (23); K.NEYAAQLQR.F (46); R.ELVAENLSVR.V (65); K.RLQQLEER.S (39); R.RAQQLENGFK.Q (57); K.EGEGYVPTSILR.V (46); R.APSDSSLGTPSDGRPELR.G (67)
264	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	transcription/ translation	P61978	51230/5.39	60000/5.07	261	10	25	pH 4-7	K.DLAGSIIGK.G (40); R.GGDLMAYDR.R + Oxidation (M) (69); R.VVLGGKPDV.V (69); K.GSDFDCELR.L (40); R.NTDEMVELR.I + Oxidation (M) (72); R.NLPLPPPPR.G (40); K.IDEPLEGSER.I (89); K.RPAEDMEEEQAFK.R + Oxidation (M) (58); R.TDYNASVSPDSSGPER.I (54); R.GSYGDLGGPIITQVTIPK.D (20)

265	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	transcription/ translation	P61978	51230/5.39	60000/5.07	298	10	21	pH 4-7	K.DLAGSIIGK.G (35); R.GGDLMAYDR.R + Oxidation (M) (65); R.VVLIGGKPD.R.V (67); K.GSDFDCELR.L (57); R.NTDEMVELR.I + Oxidation (M) (60); R.NLPLPPPPPR.G (48); K.IDEPLEGSER.I (93); K.RPAEDMEEEQAFK.R + Oxidation (M) (58); K.RPAEDMEEEQAFK.S + Oxidation (M) (29); R.GSYGDLGGPIITTQVTIPK.D (78)
267	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	transcription/ translation	P61978	51230/5.39	60000/5.07	62	11	23	pH 4-7	-
268	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (CRMP2)	growth/ differentiation/ mitosis	Q16555	62711/5.95	57000/5.50	436	13	30	pH 4-7	K.VFNLYPR.K (44); K.SSAEVIAQAR.K (75); R.GSPLVVISQK.I (75); R.KPFPDFVYK.R (36); K.GIQEEMEALVK.D + Oxidation (M) (55); K.QIGENLIVPGVK.T (38); R.GLYDGPVCEVSVTPK.T (81); K.DHGVNSFLVYMAFK.D + Oxidation (M) (45); K.IVLEDGTLHVTEGSGR.Y (69); K.MDENQFVAVTSTNAAK.V + Oxidation (M) (79); K.DNFTLIPEGTNGTEER.M (29); R.AITIANQTNCPYITK.V (71); R.FQMPDQGMTSADDFQGTK.A + 2 Oxidation (M) (106)
268	Protein disulfide-isomerase A3	chaperone	P30101	57146/5.98	57000/5.50	263	11	25	pH 4-7	K.QAGPASVPLR.T (58); R.TADGIVSHLK.K (38); K.FVMQEEFSR.D + Oxidation (M) (41); R.LAPEYEAATR.L (64); R.DGEEAGAYDGPR.T (73); R.GFPTIYFSPANK.K (77); R.FLQDYFDGNL.K (61); K.SPIPESNDGPVK.V (48); R.ELSDFISYLQR.E (25); R.EATNPPVIQEEKPK.K (48); K.MDATANDVPSPEYR.G + Oxidation (M) (29)
268	FK506-binding protein 4	growth/ differentiation/ mitosis	Q02790	52057/5.35	57000/5.50	258	10	25	pH 4-7	K.LEQSTIVK.E (39); K.DKFSFDLGGK.G (30); K.LYANMFER.L + Oxidation (M) (48); K.TQLAVCQQR.I (63); K.ALELDSNNEK.G (61); K.FQIPPNAELK.Y (20); R.EGTGTEPMIGDR.V + 2 Oxidation (M) (38); K.LQAFSAAIESCNK.A (72); K.GEDLTHEEDGGIIR.R (88); K.ATESGAQSAPLMEGVDISPK.Q + Oxidation (M) (55)



268	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	metabolism	P21281	56807/5.57	57000/5.50	90	3	6	pH 4-7	R.SGQVLEVSGSK.A (56); R.TPVSEDMLGR.V + Oxidation (M) (33); R.QIYPPINVLPSLSR.L (67)
268	Spliceosome RNA helicase BAT1	transcription/ translation	Q13838	49416/5.44	57000/5.50	81	3	8	pH 4-7	K.ILNVDVQDR.F (60); K.MLEQLDMR.R + 2 Oxidation (M) (35); R.ILVATNLFGR.G (53)
268	Eukaryotic translation initiation factor 5	transcription/ translation	P55010	49648/5.41	57000/5.50	75	5	12	pH 4-7	R.VNILFDFVK.K (49); K.VLTLSDDL.R.T (46); K.LQDMLDGF.K + Oxidation (M) (37); K.ALNRPPTYPTK.Y (26); K.SDNKDDDDIDAL.- (37)
270	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	transcription/ translation	P31943	49484/5.89	49000/5.30	80	13	32	pH 4-7	-
272	Annexin A3	signaling	P12429	36524/5.63	32500/5.52	131	13	47	pH 4-7	-
273	Annexin A4	signaling	P09525	36088/5.84	32000/5.65	187	20	53	pH 4-7	-
274	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	metabolism	P62140	37961/5.84	36000/5.45	74	11	35	pH 4-7	-
275	NSFL1 cofactor p47	signaling	Q9UNZ2	40548/4.99	44000/5.02	64	8	22	pH 4-7	-
276	Elongation factor 1-delta	transcription/ translation	P29692	31217/4.90	33000/4.88	259	7	31	pH 4-7	R.LNVLEK.S (41); K.LVPGVY.GIR.K (41); R.QENGASVILR.D (66); R.GVVQELQQ.AISK.L (82); K.VGTDLLEEEITK.F (64); R.IASLEVENQSLR.G (99); R.FYEQMNGPV.AGASR.Q + Oxidation (M) (80)
277	<b>Tubulin beta-2C chain</b>	structural protein	P68371	50255/4.79	57000/4.78	163	4	9	pH 4-7	R.FPGQLNADLR.K (59); K.LAVNMVPPFR.L + Oxidation (M) (65); R.INVYYNEATGGK.Y (72); K.EVDEQMLNVQNK.N + Oxidation (M) (66)
277	<b>Tubulin beta chain</b>	structural protein	P07437	50095/4.78	57000/4.78	157	4	9	pH 4-7	R.FPGQLNADLR.K (59); K.LAVNMVPPFR.L + Oxidation (M) (65); R.ISVYYNEATGGK.Y (66); K.EVDEQMLNVQNK.N + Oxidation (M) (66)
277	<b>Tubulin beta-2A chain</b>	structural protein	Q13885	50274/4.78	57000/4.78	121	3	9	pH 4-7	R.FPGQLNADLR.K (59); K.LAVNMVPPFR.L + Oxidation (M) (65); K.EVDEQMLNVQNK.N + Oxidation (M) (66)
277	<b>Tubulin beta-6 chain</b>	structural protein	Q9BUF5	50281/4.77	57000/4.78	119	3	9	pH 4-7	R.FPGQLNADLR.K (59); K.LAVNMVPPFR.L + Oxidation (M) (65); K.EVDEQMLAIQSK.N + Oxidation (M) (64)
277	Importin subunit alpha-7	signaling	O60684	60733/4.89	57000/4.78	94	4	3	pH 4-7	R.EEEGIQLR.K (49); R.REEEGIQLR.K (50); K.NNALNPEEMR.R + Oxidation (M) (61); K.NNALNPEEMRR.R + Oxidation (M) (33)
278	<b>Tubulin alpha-1B chain</b>	structural protein	P68363	50804/4.94	55000/5.05	61	11	38	pH 4-7	-
279	<b>Tubulin alpha-1C chain</b>	structural protein	Q9BQE3	50548/4.96	56000/5.13	79	10	30	pH 4-7	-
279	<b>Tubulin alpha-1A chain</b>	structural protein	Q71U36	50788/4.94	56000/5.13	78	10	30	pH 4-7	-

279	<b>Tubulin alpha-1B chain</b>	structural protein	P68363	50804/4.94	56000/5.13	78	10	30	pH 4-7	-
281	Calumenin	signaling	O43852	37198/4.47	44000/4.30	82	3	10	pH 4-7	R.EQFVEFR.D (26); K.TFDQLTPEESK.E (53); K.IDGDKDGFVTVDELK.D (64)
282	Chloride intracellular channel protein 1	signaling	O00299	27248/5.09	32000/5.10	120	10	52	pH 4-7	-
285	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	metabolism	O43175	57356/6.29	56000/6.40	370	7	15	pH 4-7	K.FMGTELANGK.T + Oxidation (M) (54); K.QADVNLVNAK.L (81); R.GGIVDEGALLR.A (92); K.VTADVINAEEK.L (84); K.ILQDGGGLQVVEK.Q (108); K.GTIQVITQGTSLK.N (95); R.AGTGVDNVDLEAATR.K (64)
285	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	metabolism	P11413	59675/6.39	56000/6.40	60	3	5	pH 4-7	K.LPDAYER.L (44); R.GPTEADELMK.R + Oxidation (M) (46); R.GPTEADELMKR.V + Oxidation (M) (33)
289	<b>Tubulin alpha-1A chain</b>	structural protein	Q71U36	50788/4.94	56000/5.16	253	6	19	pH 4-7	K.EIIDLVLDL.I (47); R.QLFHPEQLITGK.E (33); R.AVFDLEPTVIDEVR.T (71); R.IHFPLATYAPVISAEK.A (89); K.VGINYQPPTVPPGGDLAK.V (26); K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H (128)
289	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	metabolism	Q01581	57828/5.22	56000/5.16	179	4	12	pH 4-7	R.LEVGTETIIDK.S (67); R.TGVAPDVFENMK.L + Oxidation (M) (54); K.NSIYSGLEAFGDVK.L (109); R.MLLNDFLNDQNR.D + Oxidation (M) (52)
290	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	metabolism	P05091	56859/6.63	56000/5.81	179	3	7	pH 4-7	K.LGPALATGNVVMK.V + Oxidation (M) (74); K.EEIFGPVMQILK.F + Oxidation (M) (49); R.ANNSTYGLAAAVFTK.D (124)
290	<b>Septin-8</b>	growth/ differentiation/ mitosis	Q92599	56234/5.89	56000/5.81	175	5	14	pH 4-7	K.VNIPIIAK.A (36); K.EFLSELQR.K (27); K.LTIVDAVGFQDQINK.D (99); R.LRPQTYDLQESNVQLK.L (97); K.AAVEALQSQUALHATSQQPLRK.D (36)
292	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	metabolism	P04181	48846/6.57	45000/6.05	127	4	12	pH 4-7	K.GLLNAIVIK.E (47); R.ESIEIINK.T (28); K.LPSDVVTAVR.G (54); K.TVQGPPTSDDIFER.E (94)
293	PDZ domain-containing protein GIPC1	signaling	O14908	36141/5.90	39000/6.04	184	3	12	pH 4-7	R.NPDELAELDER.L (84); R.DTELAATMVELGK.D + Oxidation (M) (77); R.GPATVEDLPSAFEEK.A (90)
296	Major vault protein	signaling	Q14764	99551/5.34	97000/5.25	371	8	10	pH 4-7	K.ELPPGVEELLNK.G (41); R.GAVASVTFDDFHK.N (25); K.LFSVPDFVGDACK.A (67); R.VPHNAAVQVYDYR.E (68); K.AQALAIETEAEELQR.V (122); K.EVEVVEIIQATIIR.Q (81); R.KEVEVVEIIQATIIR.Q (101); R.LAQDPFPLYPGEVLEK.D (74)

297	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	transcription/translation	P61978	51230/5.39	60000/5.07	116	3	8	pH 4-7	R.NLPLPPPPPR.G (38); K.IILDLISESPIK.G (73); R.TDYNASVSVDPSSGPER.I (68)
298	<b>Tubulin alpha-1A chain</b>	structural protein	Q71U36	50788/4.94	58000/5.10	170	3	9	pH 4-7	K.EIIDLVLDLDR.I (74); R.NLDIERPTYTNLNR.L (24); K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H (127)
298	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	signaling	P52306	67073/5.17	58000/5.10	151	4	7	pH 4-7	R.NLAIPVINK.A (24); K.VANIIAEVAK.N (50); K.MLSAGVTEAVLK.F + Oxidation (M) (82); K.EQFASTNIAEELVK.L (80)

proteins identified in Xenopus Meiotic Microtubule-Associated proteome - Gache V, 2010

proteins identified in Microtubule-associated Proteins during Macrophage Activation- Patel PC, 2009

proteins identified in Proteomic profiling of Taxol-resistant MCF-7 breast cancer cells – Chuthapisith S, 2007

proteins frequently identified in proteomics - Petrak J, 2008

Microtubule-Associated proteins of interest in our study

(a) The spots numbering corresponds to the 2-DE gels in Fig. 2A and 2B.

(b) MALDI-TOF was used to identify the proteins for which sequences are not shown. The number in brackets is the Mascot peptide ions score.



### ◆ Résumé de la thèse

L'étude des modulations d'expression et de recrutement sur les microtubules de protéines présentes dans leur environnement a mis en évidence un recrutement accru de septines, en relation avec une augmentation de la tyrosination et la polyglutamylation de la tubuline, nous permettant d'élaborer un mécanisme hypothétique de résistance au Taxol de la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB 231.

### ◆ Mots clés

Chimiorésistance, Taxol, Microtubules, Tyrosination, Polyglutamylation, Septines

### ◆ Laboratoire de rattachement

Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire,

EA4530 « Dynamique des microtubules en physiopathologie »

IPSIT 141, Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

Université Paris-Sud 11

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR « FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex