N° d'ordre 52-2007 Année 2007

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le

24 avril 2007

par

Mlle BEGHIN ANNE

TITRE :

IMPLICATIONS DE LA PROTEINE ARL2 DANS LE PHENOTYPE TUMORAL ET LES MECANISMES DE CHIMIORESISTANCE DANS LE CANCER DU SEIN

Directeur de thèse : Pr. DUMONTET Charles

JURY : M. BLAY Jean Yves, Président
Mme. BRAGUER Diane
M. JOB Didier
M. DIAZ Jean Jacques
M. BORNENS Michel
M. DUMONTET Charles

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Pr. Jean Yves Blay, Président du jury
Professeur des universités, INSERM U590, Lyon.

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Pr. Diane Braguer, Rapporteur
DR, CNRS-FRE 2737, Université de la Méditerranée, Marseille.

Vous avez accepté de juger ce travail. Vos compétences, votre soutien et votre disponibilité m'ont été très précieux au cours de ces années. Trouvez ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

Pr. Didier Job, Rapporteur
DR, Université Joseph Fourier, INSERM U366, et Centre d'Etude Atomique, Grenoble.

Vous avez accepté d'être rapporteur de ce travail. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Dr. Jean Jacques Diaz
CR1, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR 5534, Lyon.

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Vos compétences sur la ribogénèse et votre disponibilité m'ont été précieuses dans l'élaboration de ce travail.

Pr. Michel Bornens
DR, Institut Curie et CNRS-UMR 144, Paris.

Vous avez accepté de siéger dans ce jury. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Pr. Charles Dumontet, directeur de thèse
PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon et INSERM U590

Je vous suis reconnaissante de la liberté que vous m'avez accordée et de vos conseils tout au long de ce travail. Trouvez en cette thèse l'expression de mes profonds remerciements.

Un grand merci :

A l'équipe du Dr. Diane Braguer, pour leur acceuil et collaboration et plus particulièrement à Stéphane Honoré pour son aide précieuse.

A l'équipe du Dr. Jean-Jacques Diaz, pour leur collaboration et discussions qui ont été et seront fructueuses. Merci à Anna Greco, Karine Kindbeiter, et à Stéphane Belin.

A l'équipe du Pr. Jean-Marc Lancelin, à Anne-sophie Bretonnet et à Isabelle Krimm pour notre collaboration « RMNique ».

A l'équipe du Centre Commun de Quantimétrié : Dr. Yves Tourneur, Denis, Batoul et Sophie. Merci pour vos compétences et votre disponibilité qui m'ont permis d'acquérir une bonne partie de mes résultats.

Au Dr. Claude Caron de Fromentel, de l'Unité U590, pour ses conseils et révisions sur la partie « p53 ».

Au Dr. Isabelle Treilleux, à Sophie Goddard, au Dr. Eric Tabone pour leur aide « anatomopathologique ».

Au Dr. Martine Ffrench et à toute son équipe : Amel, Weiwen, Tagrid, et Estelle. Merci pour votre soutien logistique et psychologique.

Au laboratoire de cytologie analytique :

Dr. Carlos Galmarini et Dr. Lars Jordheim.

Je n'aurais certainement pas réussi sans votre aide et ni vos conseils. Merci pour les discussions passionnantes et pour vos encouragements. Merci pour les bourses (surtout Lars !). Je vous considère comme mes « frères de labo ».

Emeline, Eva et Stéphanie,

Pour m'avoir formée, épaulée et supportée pendant ces années. Pour St Agrève (Emeline et Eva), pour le Saboteur (Stéphanie). Pour le bureau des « nouilles ». Merci pour tout ! Et n'oublions pas : « Joie de vivre, nouilles en salade ! » (Jack Nicholson, « *Pour le pire et pour le meilleur »)*.

A tous les cytologiens : Sandra, Rouba, Stéphane, Sabrina, Pascal, Jennifer, Yongoua, Mylène, Sophie, Pascale, Léa. A Céline et Arman pour leur aide.

Et un immense merci :

A Sébastien,

Pour ta patience, tes conseils, ton aide et ton soutien sans faille au cours de ces années, et surtout pour notre amour.

A mes parents,

Pour votre soutien moral et financier tout au long de ces années. Pour avoir toujours cru en moi. Rien n'aurait été possible sans vous.

A Domi, Damian, Philippe, Prakkal, Camille, Thibaut, Mathilde, et Henri

Pour les moments de détente et de bonheur : pour les grosses vagues du Cap-Ferret, pour les parties de Uno, pour les tempêtes de neige sur les pistes de ski, pour le lac du Lauvitel, pour la baignade dans la baie de Kekova avec Paco, pour notre descente mémorable de l'Ardèche, pour les Noëls à Kerelkun et pour les autres moments de joie à venir.

A mes amis :

Marie, Nicolas,

Pour notre enfance, les soirées de la rue Claude Bernard, les vacances, … . Pour les joies et les peines partagées. Même si le temps m'éloigne trop souvent de vous, sachez que je ne vous oublie pas.

Sandra, Sylvie, Florence, Stéphanie

Pour les foux-rires, les soirées-jeux, les pub-quizz, les défouloirs sur le « dance-floor », l'escalade, les via ferrata, les shooters (très importants !) et pour vos conseils et votre aide.

Et également un grand merci à : Sylvain, Céline, Manu, Anne, Khouzama, Jade,….

Merci enfin à l'association Externet, à la Ligue contre le Cancer-comité Saône&Loire, et à l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour leur soutien financier.

Cette thèse est dédiée à :

Madame Nicole Béghin,

Monsieur Jules Désiré Béghin†,

Monsieur le Général Louis Deconinck†,

Madame Joëlle Leroy† et à Madame Colette Jarlot,

et à toutes les personnes qui ont souffert et qui souffrent de cette maladie.

« Un système est un ensemble d'éléments dont chacun est relié aux autres par une multiplicité de relations différentes.» *Ludwig von Bertalanffy, Théorie générale des systèmes, 1948.*

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 13

1. LE SYSTEME MICROTUBULAIRE 17

1.1. Les Tubulines 18

1.1.1. αβ-tubuline 18

1.1.2. γ-tubuline 23

1.1.3. δ-tubuline 23

1.1.4. ε-tubuline 24

1.1.5. ζ-tubuline et η-tubuline 24

1.2. Les microtubules 24

1.2.1. Formation et propriétés 24

1.2.2. Structure des extrémités des microtubules 31

1.2.3. Importance et implications dans les fonctions cellulaires 32

1.3. Microtubules comme cibles thérapeutiques 41

1.3.1. Les agents dépolymérisants 41

1.3.2. Les agents polymérisants 45

1.3.3. Mécanismes cellulaires de résistance 46

1.4. Composés et processus cellulaires pouvant influencer la dynamique des microtubules 49

1.4.1. Taux d'hétérodimères polymerisables 49

1.4.2. Composition isotypique 50

1.4.3. Modifications post-traductionnelles des tubulines α et β 51

1.4.4. Exemples de protéines accessoires des microtubules 52

1.5. Dynamique des microtubules, aneuploïdie, instabilité chromosomique et cancer 59

1.5.1. Aneuploïdie, CIN et cancer 59

1.5.2. Aneuploïdie, CIN et ségrégation des chromosomes 60

1.5.3. Ségrégation des chromosomes et perturbation de la dynamique du fuseau mitotique 60

2. MISE EN CONFORMATION DES TUBULINES 62

2.1. Voie de mise en conformation des tubulines et formation de l'hétérodimère αβ-tubuline 63

2.1.1. Séquence de prise en charge 63
2.1.2. Les protéines chaperonnes 66
2.1.3. LesTubulin Binding Cofactors (TBCs) 67
2.1.4. Les pathologies associées à la mise en conformation des tubulines 72

2.2. Régulation de la mise en conformation des tubulines : Arl2 et PP2A 73

2.2.1. Arl2 74
2.2.2. PP2A 79
2.2.3. Arl2 et PP2Ac sont extrêmement bien conservées 81

2.3. Conclusion 83

3. MODELE D'ETUDE : LE CANCER DU SEIN 84

3.1. Le cancer du sein 84

3.1.1. Epidémiologie du cancer du sein 85
3.1.2. Différents types de cancer du sein 86
3.1.3. Système de classification 89
3.1.4. Autres pathologies 93
3.1.5. Facteurs de risque 95
3.1.6. Marqueurs pronostiques du cancer du sein 96
3.1.7. Cytogénétique 97

3.2. Traitements standards des cancers du sein 98

3.2.1. Chirurgie 98
3.2.2. Radiothérapie 99
3.2.3. Les traitements médicamenteux 99

4. MATERIELS ET METHODES 104

4.1. Modéles cellulaires 104
4.1.1. Modèle de cellules immortalisées : hTert-HME-1 (HME-1) 104
4.1.2. Modèles de cellules cancéreuses : MCF7 et MDA-MB-231 105

4.2. Techniques de transfection cellulaire 110
4.2.1. Construction des plasmides et transfections stables 110
4.2.2. Inhibition de l'expression génique par short interference ARN (siARN) 111

4.3. Techniques de biologie moléculaire 111
4.3.1. Séquençage du gène d'Arl2 111
4.3.2. RT-PCR quantitative en temps réel 112
4.3.3. Extraction des protéines et Western-Blot 113
4.3.4. Evaluation de l'activité phosphatase de PP2A 114

4.4. Techniques d'étude des fractions de tubulines et de la dynamique des microtubules 114
4.4.1. Séparation et quantification des fractions d'hétérodimères d'αβ-tubuline solubles polymérisables, non polymérisables et microtubulaires. 114
4.4.2. Microinjection de tubuline-rhodamine et observation en temps réel des microtubules des cellules microinjectées 117
4.4.3. Analyse de la dynamique des microtubules 117

4.5. Techniques de biologie cellulaire 118
4.5.1. Détermination de la prolifération cellulaire 118
4.5.2. Analyse de la distribution du cycle cellulaire par cytométrie de flux 119
4.5.3. Tri cellulaire selon la quantité d'ADN par cytométrie de flux 119
4.5.4. Immunofluorescence et détermination des indices mitotiques, ana-telophasiques et cytokinétiques par microscopie confocale 120
4.5.5. Quantification des cellules positives au marquage de l'Annexine V par microscopie (calcul de l'index apoptotique) 121
4.5.6. Etudes des durées des phases mitotiques par observation microscopique en temps réel des cellules 121
4.5.7. Etudes de cytotoxicité 122
4.5.8. Croissance cellulaire en agar-mou et en agar-mou/matrigel 122
4.5.9. Culture cellulaire tridimensionnelle en matrigel 123

4.5.10. Test d'infiltration du matrigel 123

4.6. Techniques d'études *in vivo* 124

4.6.1. Test de tumorogénécité *in vivo* par xénogreffes 124

4.6.2. Imagerie bioluminescente *in vivo* 124

4.6.3. Immunohistochimie des tumeurs produites par xénogreffes 125

5. ETUDE DE L'INFLUENCE D'ARL2 SUR LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES DANS DES CELLULES DE CANCER DU SEIN 126

5.1. Introduction 126

5.2. Résultats 128

5.2.1. Séquençage du gène d'Arl2 dans plusieurs lignées cellulaires de sein 128

5.2.2. Niveau d'expression d'Arl2 dans les différentes lignées utilisées 128

5.2.3. L'expression d'Arl2 influence l'équilibre entre hétérodimères polymérisables d'$\alpha\beta$-tubuline et les tubulines non polymérisables 131

5.2.4. La dynamique des microtubules des cellules vivantes est modulée par le niveau d'expression de la protéine Arl2 134

5.2.5. Arl2 régule le contenu protéique de TBC-D et le niveau protéique, la localisation et l'activité de PP2Ac 138

5.2.6. Le niveau d'expression d'Arl2 modifie la morphologie cellulaire 143

5.2.7. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la progression mitotique et cytokinétique 145

5.3. Discussion 151

6. LE CONTENU EN ARL2 INFLUENCE LA LOCALISATION DE P53 ET LA CHIMIOSENSIBILITE DE CELLULES DE CANCER DU SEIN. 156

6.1. Introduction 156

6.2. Résultats 157

6.2.1. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques 157

6.2.2. Le contenu en Arl2 n'influence pas l'arrêt en G2/M induit par les agents anti-microtubulaires....161
6.2.3. La localisation nucléaire et l'activité de p53 après exposition à différents agents chimiothérapeutiques sont différentes selon le niveau d'Arl2....163
6.2.4. L'expression d'Arl2 influence la distribution et la phosphorylation de p53....167
6.2.5. PP2A est impliquée dans la phosphorylation et dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques....171

6.3. Discussion....173

7. ETUDE DES MODIFICATIONS DU CONTENU EN ARL2 SUR LE DEVELOPPEMENT TUMORAL DES CELLULES DE CANCER DU SEIN....176

7.1. Introduction....176

7.2. Résultats....177
7.2.1. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la polarité cellulaire et la morphologie nucléolaire....177
7.2.2. L'inhibition de contact de cellules cancéreuses est corrélée avec le contenu en Arl2....181
7.2.3. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la croissance tridimensionnelle *in vitro* et le développement tumoral *in vivo*....186
7.2.4. L'organisation intratumorale et le pouvoir d'infiltration des cellules sont dépendants du niveau d'expression d'Arl2....190

7.3. Discussion....195

8. EFFETS DE LA MODIFICATION DU NIVEAU D'ARL2 SUR LE PHENOTYPE DE CELLULES IMMORTALISEES ISSUES D'EPITHELIUM MAMMAIRE NORMAL : INDUCTION D'UN POUVOIR TUMORIGENE ?....199

8.1. Introduction....199

8.2. Résulats....200
8.2.1. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la morphologie et la polarité des cellules immortalisées....200

8.2.2. Le contenu en Arl2 induit des perturbations de la ploïdie des cellules immortalisées 202
8.2.3. Le contenu en Arl2 induit des perturbations de la réponse aux traitements des cellules immortalisées 205
8.2.4. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la croissance tridimensionnelle *in vitro* des cellules immortalisées 207

8.3. Discussion 209

9. DISCUSSION GENERALE 210

10. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 212

11. REFERENCES 214

12. ANNEXES 247

12.1. Annexe 1 : article 1 247

12.2. Annexe 2 : article 2 260

12.3. Annexe 3 : article 3 276

12.4. Annexe 4 : article de synthèse 1 283

12.5. Annexe 5 : Abstracts et Posters 296

.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANT1 : Adenine nucleotide transporter 1

AO : Acide okadaïque

Arf : ADP ribosylation factor

Arl : ADP ribosylation factor like protein

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ATCC: American type culture collection

BART: Binder of Arl2

BRCA : Breast cancer antigen

C_c : Concentration critique en tubulines

CCT : Chaperonin cytosolic containing TCP1

Cdk1 : Cyclin dependant kinase 1

CIN : Chromosome instability

CLASP : CLIP-associated proteins

CLIP : Cytoplasm linker protein

DAPI : Di-aminido-phenyl-indol

DFC : Composés fibrillaires denses

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

DO : Densité optique

Doxo : Doxorubicine

DTT : Dithiotréitol

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EGTA : Acide éthylène glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tétraacetique

FC : Centre fibrillaire

FITC : Fluorescein isothiocyanate

GC : Composés granulaires

GDP : Guanosine-5'-diphosphate

Gem : Gemcitabine

GTP: Guanosine-5'-triphosphate

HA- 2N : cellules HME-1/Arl2- triées 2N

HA- 8N :cellules HME-1/Arl2- triées 8N

HA- : cellules HME-1/Arl2-

HA+ : cellules HME-1/Arl2+

HP : cellules HME-1/pcDNA3

HRD : Syndrôme d'hypoparathyroidisme, de retard mental et de déformation faciale

hTert: sous-unité catalytique de l'holoenzyme télomérase

HUGO : Human genome organization

IA : Index apoptotique

IC : Index cytokinétique

IC50 : Concentration inhibitrice 50

IκB : Inhibitor of NFκB

JNK : C-jun N-terminal

LOH : Loss of heterozygosity

MA- : cellules MCF7/Arl2-

MA+ : cellules MCF7/Arl2+

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MAPs : Microtubule associated proteins

MCAK : Mitotic centromere associated kinesin

MDAA- : cellules MDA-MB-231/Arl2-

MDAA+ : cellules MDA-MB-231/Arl2+

MDAA+luc : cellules MDAA+/luciférase

MDAA-luc : cellules MDAA-/luciférase

MDAP : cellules MDA-MB-231/pcDNA3

MDAPluc : cellules MDAPluciférase

MFK: Maladie fibrokistique

MLK2 : Mixed lineage kinase 2

MP : cellules MCF7/pcDNA3

MT : Microtubules (ou fraction microtubulaire)

MTOC: Microtubule organizing center

MTT : Methylthiazoletetrazolium

NEAA: Non essentials amino acids

NEB : Nuclear envelope breakdown

NFκB : nuclear factor kappa B

NLS : Nuclear localisation sequence

NPT : Tubulines non polymérisables

PE : Phycoérythrine

PIG3: p53-induced gene 3

PP2A : Protein phosphatase 2A

PP2Ac : sous unité catalytique de PP2A

PT : Tubuline polymérisables

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RP2 : Protéine de la rétinite pigmentaire 2

RT-PCR : Transcription inverse et réaction de polymérase en chaîne

SARs : Secretion associated and RAS-related protein

siARN: short interference ARN

STOP : Stable tubule-only polypeptide

TAX : Taxotère

TBA : Tubulin binding agents

TBCs: Tubulin binding cofactors

TCP1 : T complex polypeptide 1

TTL : Tubuline tyrosine ligase

Tx : Taxol

UA : Unités arbitraires

UICC : Union internationale contre le cancer

Vnb : Vinorelbine

XL-RP : Rétinite pigmentaire liée à l'X

αtub : α-tubuline

βtub : β-tubuline

PARTIE I :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE SYSTEME MICROTUBULAIRE

Les microtubules résultent de la polymérisation des dimères de tubulines et constituent l'un des composés majoritaires du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils sont impliqués dans de nombreux processus indispensables à la vie cellulaire tels que la division cellulaire, la motilité cellulaire, le trafic intracellulaire. De part leur importance dans la prolifération cellulaire, ils sont devenus la cible d'agents chimiothérapeutiques anticancéreux. De nombreux scientifiques appartenant à des domaines de recherche différents ont étudié leurs étonnantes propriétés biophysiques afin de comprendre les mécanismes impliqués dans leur fonctionnement.

1.1. Les Tubulines

1.1.1. αβ-tubuline

L' α-tubuline et la β-tubuline sont deux protéines de séquences différentes et codées par des gènes différents. Une protéine d'α-tubuline s'associe à une protéine de β-tubuline pour former le motif de base et le composé majoritaire des microtubules. Cet hétérodimère d'αβ-tubulines a été longtemps identifié comme « la tubuline » jusqu'à la découverte d'autres tubulines décrites plus loin.

Des analyses séquentielles ont révélé que les séquences d'acides aminés de ces tubulines alpha et beta sont généralement bien conservées entre les espèces eucaryotes (Sullivan *et al.*, 1986, Sullivan *et al.*, 1984). Cette remarquable conservation de séquences provient des contraintes imposées par la structure tertiaire de l'hétérodimère d'αβ-tubulines. Par des études crystallographiques, Nogales et al. ont développé un modèle atomique permettant une reconstitution tridimensionnelle de l'hétérodimère αβ-tubuline (Nogales *et al.*, 1998) (Figure 1). Elle montre que les deux monomères α et β possèdent des structures quasi identiques comportant trois domaines fonctionnels :

le domaine N-terminal (résidu 1-206), composé de 5 hélices α (H1 à H5) et de 6 feuillets β parallèles (B1 à B6), constitue le site de liaison des nucléotides guanidiques. Ce site de liaison est non échangeable (site N) pour le monomère α et semble ne jouer qu'un rôle structural. En revanche, la sous unité β possède un site échangeable de nucléotides guanidiques (site E). Ce site est donc le siège de

l'hydrolyse de GTP en GDP nécessaire à la polymérisation des hétérodimères en microtubules,

le domaine intermédiaire comportant les hélices α H6 à H10 et les feuillets β B7 à B10 constitue le domaine de liaison du paclitaxel,

le domaine C-terminal (hélices α H11 et H12), exposé sur la face extérieure des microtubules, est impliqué dans la liaison aux nombreuses protéines associées aux microtubules et dans les liaisons longitudinales avec le monomère voisin au sein du même protofilament.

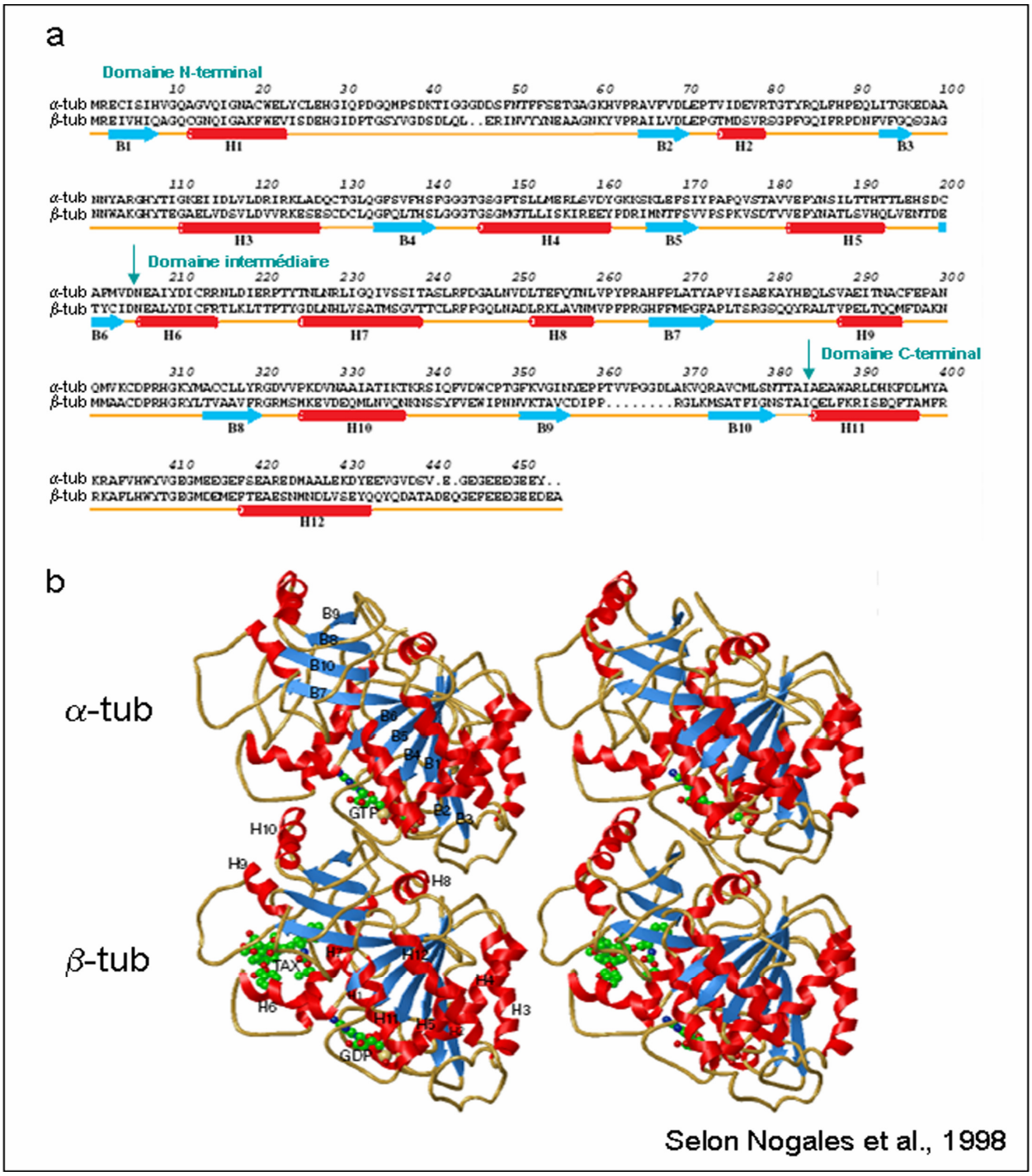


Figure 1 : (a) Séquences des α- and β-tubulines utilisées dans le modèle atomique de Nogales et al. et structures secondaires associées (rouge : hélice α, bleu : feuillet β) et (b) représentation tridimensionnelle de la face externe d'un microtubule montrant les α-tubulines liées au GTP (en haut) et les β-tubulines liées au GDP et au taxotère (TAX) (en bas) (Nogales *et al.*, 1998).

La plupart des organismes eucaryotes possèdent plusieurs gènes codant pour différents isotypes d'α- et de β-tubulines, dont la spécificité de séquence se situe dans la région C-terminale (Sullivan *et al.*, 1986). Cette diversité est augmentée par un kaléidoscope de modifications post-traductionnelles (MacRae, 1997).

Chez l'humain, il y a, à ce jour, 7 gènes référencés codant pour l'α-tubuline (+2 pseudogènes) et 9 pour la β-tubuline (+5 pseudogènes) par le Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Committee (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/). Dans la littérature, 7 protéines correspondantes à différents isotypes de β-tubulines ont été identifiés (Dumontet, 2000). Les isotypes de β-tubulines sont exprimés différentiellement selon les tissus. Leur classification et leur profil d'expression tissulaire sont décrits dans le tableau 1 (Correia *et al.*, 2001, Hiser *et al.*, 2006). L'existence d'un isotype de classe VII (h4q), exprimé exclusivement dans les neurones, est probable (Dumontet, 2000).

Tableau 1 : Classification et distribution tissulaire des isotypes de β-tubuline.

Isotypes β-tubuline (protéine, gène)	Séquences C-terminale[1]	Distribution tissulaire[2]
classe I, HM40	DATAEEEEDFGEEAEEEA	ubiquitaire
classe II, Hβ9	DATADEQGEFEEEEGEDEA	tissu nerveux
classe III, Hβ4	DATAEEEGEMYEDDEEESEAQGPK	cerveau
classe IVa, H5β,	DATAEEGEFEEEAEEEVA	cerveau
classe IVb, Hβ2	DATAEEEGEFEEEAEEEVA	ubiquitaire
classe V	DATANDGEEAFEDEEEEIDG	ubiquitaire
classe VI, Hβ1	DAKAVLEEDEEVTEEAMAPEDKGH	tissu hématopoïétique

1 : selon (Hiser *et al.*, 2006)
2 : (Dumontet, 2000)

En plus de ces différents isotypes, les dimères de tubuline sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles telles que tyrosination/détyrosination, acétylation/dé acétylation, polyglutamylation, polyglycylation et phosphorylation. Selon l'enzyme impliquée, ces modifications se produisent soit au niveau des dimères de tubulines non incorporés aux microtubules soit au niveau des dimères polymérisés en microtubule. Même si ces modifications semblent être bien conservées à travers l'évolution, leurs fonctions restent néanmoins assez floues. Nous discuterons de l'implication potentielle de ces modifications ainsi que des différents isotypes dans la dynamique des microtubules dans un paragraphe ultérieur.

En plus de l'α- et de la β-tubuline, plusieurs autres tubulines ont été identifiées et le nombre de classes de tubulines est désormais de 7 (McKean *et al.*, 2001, Oakley, 2000). La plupart de ces tubulines ont des localisations cellulaires distinctes et possèdent des fonctions diverses.

1.1.2. γ-tubuline

La γ-tubuline possède approximativement 30% d'homologie de séquence avec l'α- et la β-tubuline et semble être présente dans tous les organismes eucaryotiques. Elle est localisée au niveau des centrosomes (ou Microtubule Organizing Center (MTOC)) où elle joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'assemblage des microtubules (ou nucléation). Cependant, il a été également montré que les cellules eucaryotes comportaient un taux élevé de γ-tubuline présente sous forme soluble. Des analyses ont révélé que la γ-tubuline avait un rôle essentiel dans la coordination des phases tardives de la mitose de façon microtubules-indépendants grâce à un point de contrôle mitotique (Prigozhina *et al.*, 2004).

1.1.3. δ-tubuline

Grâce à l'analyse des tables de données, la δ-tubuline a été identifiée chez l'Homme, la Souris, le Rat et le Trypanosome. La δ-tubuline a été immunolocalisée au niveau de la région centrosomale dans une zone comprise entre les 2 centrioles. Elle est également observée au niveau de la zone intercentriolaire de 2 centrosomes dupliqués (Chang *et al.*, 2000). Cependant, chez la Souris, cette protéine semble être présente à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de cellules somatiques (Smrzka *et al.*, 2000).

1.1.4. ε-tubuline

La ε-tubuline est localisée au niveau de la zone centriolaire des cellules de mammifères. Cette localisation semble être dépendante du cycle cellulaire. Pendant les premières étapes de la mitose, l'ε-tubuline s'associe principalement avec le centrosome parental. En fin de mitose, elle est localisée à la fois au niveau du centrosome parental et du centrosome dupliqué, bien après la séparation des 2 centrosomes (Tassin *et al.*, 1999).

1.1.5. ζ-tubuline et η-tubuline

La ζ-tubuline a été découverte chez *Trypanosoma brucei* et *Leishmania major* (Vaughan *et al.*, 2000). Cependant, par des analyses des bases de donnés des séquences, il semble évident que cette branche de la superfamille des tubulines existe également dans d'autres organismes (Dutcher, 2003).

La η-tubuline a été découverte par des investigations génétiques chez *Paramecium* et est encodée par le gène nommé *SM19* (Ruiz *et al.*, 2000). La mutation *sm19-1* provoque chez le *Paramecium* une délocalisation de la η-tubuline.

1.2. Les microtubules

1.2.1. Formation et propriétés

Les microtubules sont des tubes cylindriques creux de 25 nm de diamètre (la lumière faisant 10 nm) constitué de 13 rangées linéaires d'hétérodimères appelés protofilaments.

1.2.1.1. La nucléation

La formation du microtubule (ou nucléation) est le processus par lequel plusieurs molécules interagissent pour former une structure cylindrique (Job *et al.*, 2003). La nucléation des microtubules peut se produire spontanément *in vitro* dans des solutions contenant de la tubuline purifiée. La capacité de nucléation des microtubules est augmentée dans ces solutions de tubulines par ajout de γ-tubuline (Leguy *et al.*, 2000). Au sein de la cellule, l'assemblage des microtubules est majoritairement amorcé par les complexes en anneau de γ-tubuline.

1.2.1.2. Les propriétés dynamiques

Les hétérodimères d'αβ-tubuline s'associent de façon à avoir un motif répété α–β–α–β etc. Toutes les α-tubulines constitueront une même extrémité et les β l'autre extrémité du microtubule. Ainsi, le motif interne répété d'α- et β-tubuline confère aux microtubules sa polarité et ses propriétés dynamiques dues aux différences de propriétés physicochimiques entre les 2 extrémités (Downing *et al.*, 1998, Downing *et al.*, 1998, Job *et al.*, 2003).

L'extrémité ayant les α-tubulines exposées :

- est dénommée extrémité moins,
- est généralement localisée au niveau des MTOC,
- a la vitesse de croissance la plus lente.

L'extrémité ayant les β-tubulines exposées :

- est appelée extrémité plus,
- est généralement orientée vers la membrane cellulaire en interphase ou vers les chromosomes en mitose,

- possède la plus grande rapidité de croissance.

La croissance et la décroissance du microtubule ne s'accomplissent pas par polymérisation ou dépolymérisation de sous unités hétérodimériques isolées mais impliquent la présence de polymères intermédiaires différents des microtubules dont nous parlerons par la suite. Ce système biologique de polymérisation/dépolymérisation est unique (Nogales *et al.*, 2006). L'hydrolyse du GTP lié à la β-tubuline est indispensable à la polymérisation et ne peut s'accomplir que lorsqu'il y a contact entre les dimères de tubulines.

Les capacités dynamiques des microtubules incluent 2 phénomènes :

1.2.1.2.1. Le « tapis roulant » (ou treadmilling)

La concentration critique (C_c) d'une extrémité est la concentration d'hétérodimères libres pour laquelle l'extrémité du microtubule est stable et ne subit aucun raccourcissement ni allongement. La C_c de l'extrémité moins est supérieure à la C_c de l'extrémité plus. Ceci est dû au fait que, les 2 extrémités ayant des tubulines exposées différentes (soit α soit β), elles sont morphologiquement différentes. Lorque la concentration de tubulines libres polymérisables est comprise entre les 2 C_c, ce qui est le cas dans les cellules, les microtubules subissent le phénomène de « tapis roulant ». Lorsque l'extrémité moins n'est pas ancrée au niveau du complexe centrosomal, le phénomène de « tapis roulant » induit un déplacement du microtubule. Lorsque le microtubule est retenu au niveau de son extrémité moins par le complexe centrosomal, le phénomène provoque un flux polarisé des sous-unités de tubulines polymérisées induisant des forces mécaniques internes au microtubule (figure 2). Ces forces sont indispensables à l'établissement et au fonctionnement du fuseau mitotique (Margolis *et al.*, 1978) et permettent le transport passif de protéines

et d'organelles associées tels les chromosomes (Garel *et al.*, 1987, Waters *et al.*, 1996).

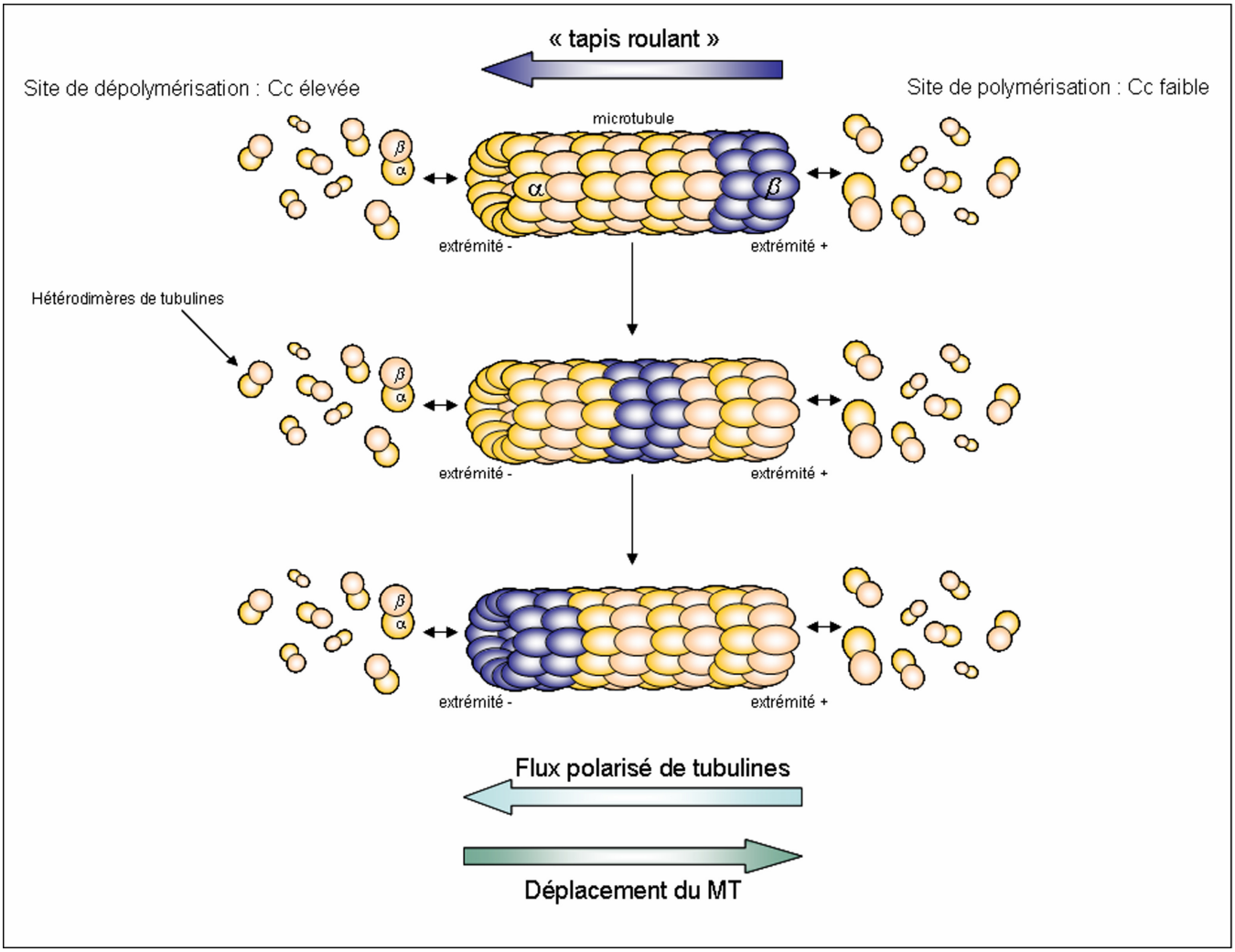


Figure 2 : Phénomène de « tapis roulant ». La différence entre les 2 concentrations critiques (C_c) de tubulines (C_c extrémité moins > C_c extrémité plus) induit un phénomène de « tapis roulant » qui se produit dans les cellules vivantes. Lorsque le microtubule (MT) est retenu au niveau de son extrémité moins par le complexe centrosomal, le phénomène provoque un flux polarisé des sous unités de tubulines polymérisées induisant des forces mécaniques internes au microtubule. Lorsque l'extrémité moins n'est pas ancrée au niveau du complexe centrosomal, le phénomène de « tapis roulant » induit un déplacement du microtubule.

1.2.1.2.2. Le phénomène d'instabilité dynamique

Ce phénomène caractérise le fait que, pour une concentration de tubulines libres donnée (différente des C_c), une extrémité microtubulaire subit des transitions rapides entre phase de croissance lente (ou polymérisation) et phase de décroissance rapide (ou dépolymérisation). La transition à une phase de décroissance est appelée catastrophe et celle à une phase de polymérisation est nommée sauvetage. La différence entre les vitesses de polymérisation / dépolymérisation est due à la différence structurelle existant entre une extrémité en cours de polymérisation et en cours de dépolymérisation. Une extrémité microtubulaire croissante est composée d'hétérodimères liés à des GTP. Les protofilaments sont alors maintenus dans une conformation linéaire grâce aux liaisons bilatérales des hétérodimères formant ainsi une coiffe stable de tubulines-GTP permettant la polymérisation de sous unités une par une. A l'inverse, une extrémité se dépolymérisant est composée de tubulines-GDP. Les protofilaments ont alors une conformation relâchée et incurvée permettant la perte rapide de plusieurs hétérodimères à la fois (figure 3).

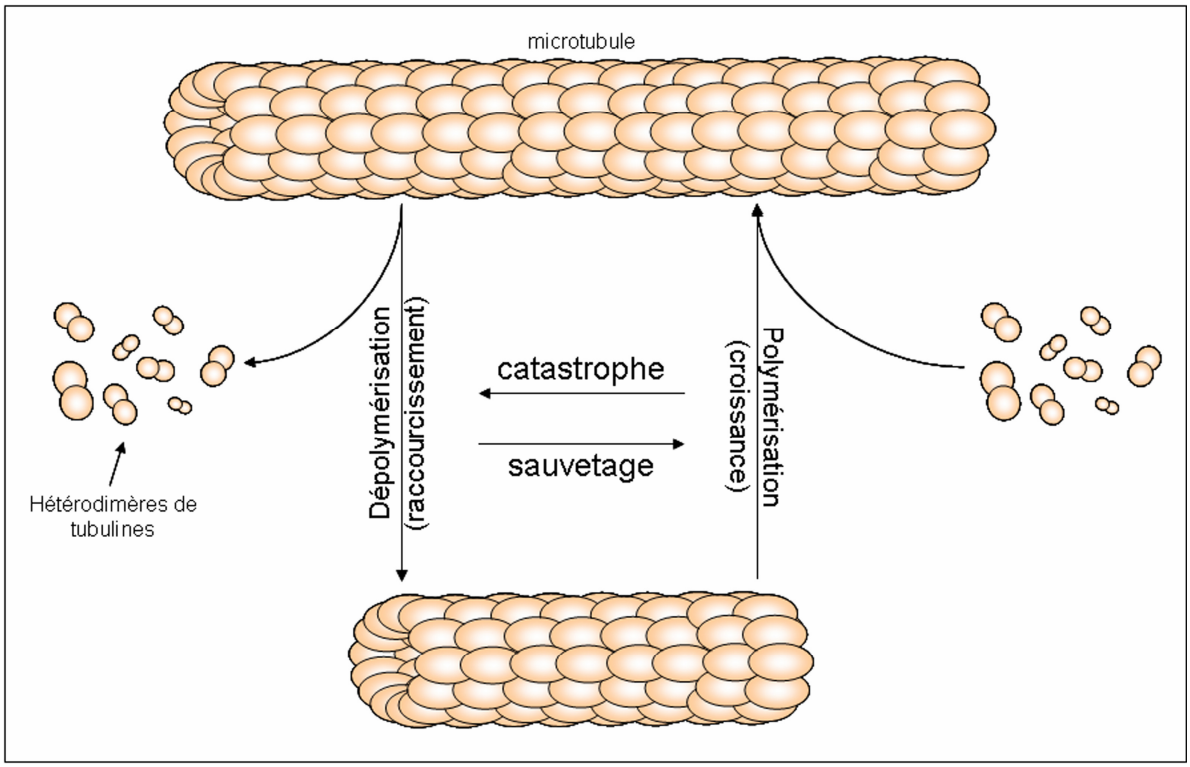


Figure 3 : Phénomène d'instabilité dynamique. A une concentration de tubulines libres donnée (différente des C_c), une extrémité (+ ou -) microtubulaire subit des transitions rapides entre phase de croissance lente (ou polymérisation) et phase de raccourcissement rapide (ou dépolymérisation). La transition à une phase de décroissance est appelée catastrophe et celle à une phase de polymérisation est nommée sauvetage.

1.2.2. Structure des extrémités des microtubules

La polymérisation et la dépolymérisation des microtubules ne consistent pas en une simple croissance ou décroissance en hélice mais fait intervenir des structures polymériques intermédiaires et transitoires, bien distinctes de la structure microtubulaire et sans aucune similarité avec d'autres systèmes biologiques d'auto-assemblage (Nogales *et al.*, 2006).

1.2.2.1. Extrémités en croissance : feuillet ouvert qui se referme en cylindre

Au niveau des extrémités en croissance, des contacts latéraux se font de façon à avoir des liaisons α–α tubulines et β–β tubulines. La structure résultante est donc un feuillet ou ruban (Chretien *et al.*, 1995, Nogales *et al.*, 2006). La fermeture du microtubule se fait alors par fermeture de ce feuillet sur lui-même pour former un tube cylindrique creux (figure 4).

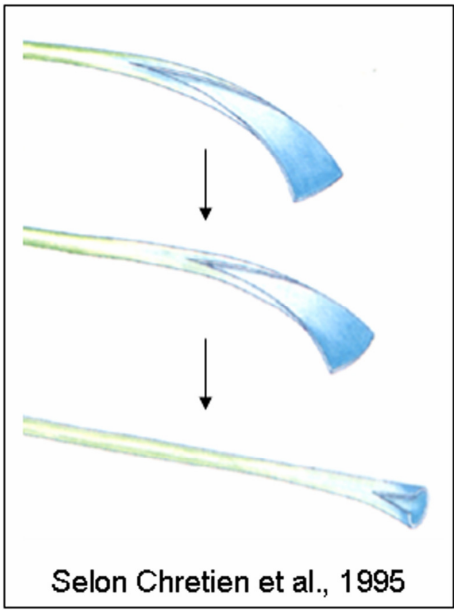


Figure 4 : Schéma d'une extrémité microtubulaire en croissance. Les microtubules s'allongent par la formation d'un feuillet incurvé (bleu) qui se referme sur lui-même pour former la structure tubulaire du microtubule (vert) (Chretien *et al.*, 1995).

1.2.2.2. Extrémités en raccourcissement : pelures de protofilaments incurvés

Les contacts interdimères sont indispensables à l'hydrolyse du GTP lié à la β-tubuline. L'hydrolise de ce GTP en GDP affecte en retour la force des contacts latéraux. Par conséquent, les extrémités des microtubules en dépolymérisation vont alors se présenter comme des pelures de protofilaments capables de s'enrouler sur eux-mêmes (Mandelkow *et al.*, 1991, Nogales *et al.*, 2003) (figure 5).

Figure 5 : Schéma d'une extrémité microtubulaire en décroissance. Les microtubules se dépolymérisent par la formation de pelures de protofilaments incurvés (Nogales *et al.*, 2006).

1.2.3. Importance et implications dans les fonctions cellulaires

1.2.3.1. L'architecture cellulaire

Faisant partie intégrante du cytosquelette, les microtubules interviennent dans la morphogénèse des cellules. Leur rôle dans le maintien de la forme cellulaire semble moindre que celui des microfilaments d'actine car il a été montré que ceux-ci suffisent à maintenir une certaine architecture cellulaire (Vasiliev, 1987). L'acquisition par les cellules de leur forme définitive est néanmoins dépendante des microtubules et de leur croissance. Par exemple, la participation des microtubules

dans la morphologie des fibroblastes, cellules allongées possédant quelques prolongements dans des conditions normales de culture, est clairement démontrée par la forme polygonale qu'acquièrent ces cellules après traitement par la colchicine qui détruit les microtubules (Vasiliev *et al.*, 1977).

1.2.3.2. Les contacts cellule-cellule

Il a été récemment démontré l'implication de la dynamique des microtubules au niveau des jonctions cellules-cellules. Stehbens et al. ont démontré l'existence de microtubules qui s'étendent radiallement jusqu'aux régions de contacts intercellulaires et que la suppression de la dynamique de ces microtubules spécifiques inhibe la capacité des cellules à concentrer l'E-cadherine au niveau des jonctions intercellulaires (Stehbens *et al.*, 2006).

1.2.3.3. Le transport intracellulaire

Les microtubules jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de transport intracellulaire tels les processus d'adressage et de sécrétion qui sont souvent en relation avec la polarité de la cellule. Les organites contenus dans le cytoplasme sont constamment animés de mouvements grâce à la présence des microtubules et des protéines motrices associées à ceux-ci dynéine et kinésine. Dans l'axone des cellules nerveuses, les microtubules interviennent dans le transport axonal rapide des vésicules cytoplasmiques (Baas *et al.*, 2005, Guzik *et al.*, 2004). Dans la plupart des cellules, le réticulum endoplasmique est colocalisé préférentiellement avec l'extrémité plus du microtubule alors que l'appareil de Golgi est proche de l'extrémité moins (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1995). Les protéines motrices dynéine et kinésine se lient aux membranes de l'appareil de Golgi et sont

impliquées dans le transport à partir et vers le complexe Golgien (Thyberg *et al.*, 1999). Les microtubules et la kinésine sont impliqués dans le transports des vacuoles d'endocytose vers la région périnucléaire (Apodaca, 2001). Le traitement de cellules intestinales de Rat par de la colchicine perturbe la sécrétion des glycoprotéines au pôle apical avec une redistribution vers le pôle latéral (Quaroni *et al.*, 1979). Cependant, le rôle des microtubules dans la sécrétion semble spécifique de certains types cellulaires. En effet, l'intégrité du réseau microtubulaire est essentielle à la sécrétion de protéines dans les glandes lacrymales mais pas dans les glandes parotides (Robin *et al.*, 1995).

1.2.3.4. La polarité cellulaire

Les cellules polarisées, présentes dans de nombreux organes et tissus, ont pour rôle principal de favoriser l'absorption et la sécrétion vectorielle d'ions et de molécules entre différents compartiments. Le rôle des microtubules dans l'établissement et le maintien de la polartié cellulaire a été démontré dans de nombreux types cellulaires. Ils permettent notamment le maintien des domaines membranaires apical et baso-latéral (Rodriguez-Boulan *et al.*, 1989, Rodriguez-Boulan *et al.*, 1989). Dans les cellules de rein, la désorganisation des microtubules par la colchicine est responsable d'une perturbation de la répartition des protéines membranaires telle la protéine gp330 du tube proximal (Gutmann *et al.*, 1989). Les modèles cellulaires hautement polarisés comme les cellules intestinales Caco-2, de rein MDCK et de foie WIF-B présentent tous des microtubules orientés selon un axe apico-basal avec leurs extrémités moins localisées près de la surface apicale.

1.2.3.5. La migration des cellules

La migration cellulaire est un processus indispensable à de nombreuses fonctions physiologiques non seulement au cours du développement mais aussi au cours de la vie, incluant ainsi des fonctions telles que la cicatrisation ou la surveillance immunologique. Egalement, la migration cellulaire est impliquée au sein de processus pathologiques telles que la néoangionèse et la production de métastases observées lors du développement tumoral. Il a été montré l'implication du cytosquelette d'actine dans les phénomènes de migration cellulaire nécessitant la formation de pseudopodes, la fixation et la translocation du corps cellulaire (Borisy *et al.*, 2000, Lauffenburger *et al.*, 1996). Cependant, Vasiliev et *al.* ont montré qu'un grand nombre de types cellulaires ont besoin de l'intervention des microtubules dans le processus de locomotion dirigée (Vasiliev *et al.*, 1970). Dans de nombreuses cellules cancéreuses, le réseau microtubulaire s'organise en une formation de microtubules particulièrement stables au niveau du front de migration de la cellule (Gundersen *et al.*, 1986, Gundersen *et al.*, 1989). Mikhailov *et al.* ont démontré l'existence d'une corrélation entre la dynamique des microtubules et la formation du lamellipode, protrusion cellulaire aplatie située sur le front de migration d'une cellule. Une augmentation de la durée de phase de croissance microtubulaire, du nombre d'extrémités microtubulaires dans la zone à la base des lamellipodes ainsi que de la vitesse de dépolymérisation ont été corrélé avec une locomotion cellulaire importante ainsi qu'avec une grande taille des lamellipodes. A l'inverse, une augmentation du temps passé pour les microtubules en pause est associée à des mouvements cellulaires plus lents et à des lamellipodes plus petits. Les auteurs ont ainsi émis l'idée que la dynamique des microtubules contribuerait à la locomotion cellulaire (Mikhailov *et al.*, 1998). Etonnament, il a également été montré qu'au sein

d'une même cellule la dynamique des microtubules est particulièrement augmentée au niveau de la zone cellulaire opposée au front de migration des cellules par rapport aux restes de la cellule, constituant ainsi un gradient de dynamique microtubulaire au sein de la cellule (Salaycik *et al.*, 2005).

1.2.3.6. La transduction des signaux

De nombreux travaux ont porté sur le rôle des microfilaments d'actine et de ses protéines associées dans la transduction du signal. Des études ont également montré que le réseau microtubulaire est impliqué dans la transduction des signaux. En effet, des kinases, dont la fonction de phosphorylation est une étape centrale dans la transduction du signal, sont liées aux microtubules. MAPK (mitogen activated protein kinase), via son interaction avec MAP2, peut se copolymériser *in vitro* avec les microtubules (Drewes *et al.*, 1992). D'autres études ont montré que MAPK est associée aux microtubules des dentrites de cellules nerveuses de Rat (Fiore *et al.*, 1993) ainsi qu'au MTOC d'ovocytes de Souris (Verlhac *et al.*, 1993). Enfin, il a été montré que les kinases MLK2 (mixed lineage kinase 2) et JNK (c-Jun N-terminal) kinase sont liées aux microtubules grâce à des molécules appartenant à la superfamille des protéines motrices kinésines (Nagata *et al.*, 1998). D'autres protéines intervenant dans des voies de transduction comme c-Myc ou IκB sont associées aux microtubules (Rosette *et al.*, 1995) (Alexandrova *et al.*, 1995). La dépolymérisation de ces derniers entraîne l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire κB (NFκB) par la dégradation de IκB (Bourgarel-Rey *et al.*, 2001, Huang *et al.*, 2004).

1.2.3.7. Microtubules et p53

Il y a environ 30 ans que p53 a été identifié comme l'un des premiers gènes suppresseurs de tumeur et a été très étudié dans le domaine de la recherche sur le cancer (O'Brate *et al.*, 2003). On décompte environ 40 000 publications citant cette protéine depuis les années 80. p53, souvent cité comme "gardien du génome" est un facteur de transcription spécifique activé par divers signaux de stress (Lane, 1992). L'activation de p53 entraîne la régulation de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires, les plus importants étant l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Lane, 1992). La perte de fonction de p53 entraîne un phénotype de résistance aux chimiothérapies et radiothérapies et est souvent associé avec un grade plus aggressif de tumeur. Il est à noter que dans 50% des tumeurs environ p53 est soit muté soit inactivé.

Alors que des mécanismes comme la transcription, la traduction, la stabilité protéique et les modifications post-traductionnelles ont été largement étudiés (Fojo, 2002), une approche relativement nouvelle dans ce domaine est de considérer la localisation intracellulaire de p53 comme voie de régulation de sa fonction (Lain *et al.*, 1999, Vousden *et al.*, 2000). La régulation de la localisation de p53 dépend de facteurs influençant son transport nucléaire, sa localisation intranucléaire ainsi que sa séquestration cytoplasmique. Par exemple, MDM2 est considéré comme le régulateur le plus important de l'exportation nucléaire et de la dégradation de p53. Dans un certain de nombre de tumeurs présentant une forme de p53 sauvage, la perte d'activité de p53 est associée avec une localisation cytoplasmique exclusive de ce facteur de transcription. Dans ce cas, l'exclusion de p53 du noyau est le résultat soit d'un transport hors du noyau hyperactif soit d'une séquestration cytoplasmique. De plus, il a été montré qu'un tel confinement cytoplasmique de p53

est corrélé avec une forte résistance aux chimio- et radiothérapies. Cette localisation cytoplasmique de p53 est considérée comme un facteur défavorable et indépendant de pronostique dans le cancer (O'Brate *et al.*, 2003).

Des interactions entre p53 et microtubules ont été décrites (Giannakakou *et al.*, 2002, Maxwell *et al.*, 1991). Une fraction cytoplasmique de p53 est associée aux microtubules par les protéines motrices de la famille des dynéines (Giannakakou *et al.*, 2000). En réponse au stress, p53 serait, selon certains auteurs, transporté dans le noyau grâce à ces protéines motrices (Giannakakou *et al.*, 2002, Giannakakou *et al.*, 2001, Giannakakou *et al.*, 2000). Giannakakou et al. ont décrit qu'en réponse à des traitements ciblant les microtubules et leur dynamique, p53 est transloqué dans le noyau (Giannakakou *et al.*, 2002). Cependant, à ce jour aucune donnée ne permet de déterminer si cela est induit par la perturbation de la dynamique microtubulaire ou par une libération dans le cytosol de p53 pouvant ensuite être transloqué dans le noyau. La présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) dans la séquence de p53 et l'interaction de p53 avec des protéines de transport nucléaire telle que l'importine (Kim *et al.*, 2000) sont des éléments indispensables à la présence de p53 au sein du noyau. Comme le suggèrent les travaux de Salman et al., le transport le long des microtubules des protéines possédant un NLS permettrait de rapprocher ces protéines de la membrane nucléaire mais ne serait pas suffisant pour permettre la présence de ces cibles dans le noyau (Salman *et al.*, 2005). Néanmoins, on peut conclure que l'activité nucléaire de p53 est corrélé avec l'intégrité des microtubules (Galigniana *et al.*, 2004, Pourroy *et al.*, 2004). Il a également été montré que phospho-ser15-p53 s'associait avec les centrosomes au cours de la mitose (Morris *et al.*, 2000, Tritarelli *et al.*, 2004).

1.2.3.8. L'induction de l'apoptose

La suppression de la dynamique des microtubules par des agents ciblants les microtubules est associée à l'induction de l'apoptose par un mécanisme qui reste flou (Honore *et al.*, 2005). Suite à ces traitements, des perturbations mitochondriales, telle l'altération du potentiel de la membrane mitochondriale, apparaissaient précocement (Andre *et al.*, 2002, Varbiro *et al.*, 2001). Ces perturbations permettaient ensuite la libération dans le cytosol de facteurs proapoptotiques et l'activation de caspases (Goncalves *et al.*, 2000). Certains avancent l'hypothèse que, ces effets apparaissant très précocement, ils pourraient être dus à la présence de tubulines mitochondriales (Goncalves *et al.*, 2000). Cependant, le lien entre la suppression de la dynamique microtubulaire et la voie mitochondriale d'induction de l'apoptose reste non élucidé. Bim, un facteur proapoptotique membre de la famille Bcl-2, est séquestré par les microtubules et peut donc être relâché lors de la désagrégation du réseau microtubulaire (Bouillet *et al.*, 1999). p53, dont nous avons parlé précédemment, est un facteur de transcription impliqué dans l'induction de l'apoptose et est également séquestré et transporté par les microtubules (voir précédemment). Plus généralement, des protéines séquestrées et/ou transportées par les microtubules peuvent représenter le lien entre la perturbation de la dynamique des microtubules et l'induction de l'apoptose.

1.2.3.9. La mitose

La mitose des cellules animales nécessite la présence d'un organite unique composé de microtubules : le fuseau mitotique. Cet organite permet aux cellules de posséder continuellement un effectif diploïde de chromosomes. L'assemblage et le bon fonctionnement de ce fuseau requièrent l'intervention d'une série complexe

d'événements régulés de façon spatio-temporelle. Dans le but d'assurer la ségrégation des chromatides au cours de la mitose, le fuseau microtubulaire subit des régulations importantes de ses propriétés dynamiques. Après duplication et séparation des centrosomes, les microtubules astraux donnent naissance à 2 asters (constitués de microtubules astraux, de matériel dense pericentriolaire et d'un centrosome) qui vont migrer en directions opposées. En même temps, le taux de polymères microtubulaires subit une rapide diminution correspondant au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Ensuite, au cours de la mitose, et ce jusqu'à la transition métaphase/anaphase, l'instabilité dynamique (fréquence de transitions ou turnover) des microtubules est augmentée et la masse de polymères redevient équivalente à celle de l'interphase. Ceci est indispensable au phénomène dit de « pêche aux chromosomes » qui est caractérisé par le fait que les microtubules sont capables de croître et décroître rapidement (sur des distances longues de 5 à10 µm) pour leur permettre de trouver et de se fixer aux kinétochores des centromères de tous les chromosomes (métaphase). Durant l'anaphase, la masse microtubulaire va considérablement diminuer au cours de la migration des chromosomes (Wadsworth, 1993). Finalement, il a été montré que l'induction de la cytokinèse semble être indépendante d'une régulation précise de la dynamique des microtubules (Strickland *et al.*, 2005) et nécessitent la séparation de la zone cellulaire appelée corps moyen pas un anneau contractile d'actomyosine. Des structures microtubulaires spécialisées (microtubules du sillon) sont responsables du transport de vésicules membranaires vers le site de clivage cellulaire (Straight *et al.*, 2000). A mesure que la cellule s'achemine vers la phase G1, le taux de polymères et l'instabilité dynamique reviennent à un niveau correspondant aux microtubules interphasiques (Zhai *et al.*, 1994, Zhai *et al.*, 1996). Par conséquent, une haute dynamicité

microtubulaire est indispensable à l'alignement et à la migration des chromosomes (Zhai *et al.*, 1995). L'incapacité pour les microtubules de s'attacher à tous les chromosomes au cours de la prométaphase provoque un blocage mitotique et l'induction de l'apoptose dans des cellules normales.

1.3. Microtubules comme cibles thérapeutiques

De part l'implication des microtubules dans de nombreuses fonctions cellulaires, ils sont devenus la cible de nombreux agents anticancéreux antimicrotubulaire ou (Tubulin Binding Agents (TBA)) qui sont classiquement regroupés en agents déstabilisants ou dépolymérisants (les vinca-alkaloïdes) et stabilisants ou polymérisants (les taxanes). Un grand nombre de molécules actives anti-microtubulaires sont en cours de développement et beaucoup de nouveaux médicaments ciblant les microtubules sont en cours d'essais cliniques. Il parait clair maintenant que les capacités dynamiques des microtubules plus que les modifications de la masse de polymères sont modifiées par ces TBA lors de leur utilisation à des concentrations correspondantes aux concentrations sériques obtenues après administration chez des patients. Leur action cytotoxique consiste alors en un blocage de la dynamique du fuseau mitotique bloquant ainsi la division cellulaire à la transition métaphase/anaphase de la mitose et induisent une mort cellulaire par apoptose (Honore *et al.*, 2005, Jordan, 2002, Jordan *et al.*, 1998, Jordan *et al.*, 2004).

1.3.1. Les agents dépolymérisants

Le premier agent antitubuline utilisé chez l'Homme est la colchicine, extraite de la *Colchicine autumnale*, prescrite dans le traitement de la goutte depuis plus de

6 siècles. La Colchicine forme des complexes avec les dimères solubles de tubulines et s'incorporent dans les microtubules supprimant ainsi la dynamique et la polymérisation des microtubules. Les agents se liant au domaine de liaison de la Colchicine de la tubuline telles les combrestatines font l'objet d'intenses investigations comme agent ciblant la vascularisation des tumeurs (Jordan *et al.*, 2004).

Les *Vinca* alcaloïdes (vincristine, vinblastine, vinorelbine, vindésine et vinflunine) ont été les premiers agents antitubulines à être utilisés comme antimitotiques (figure 6).

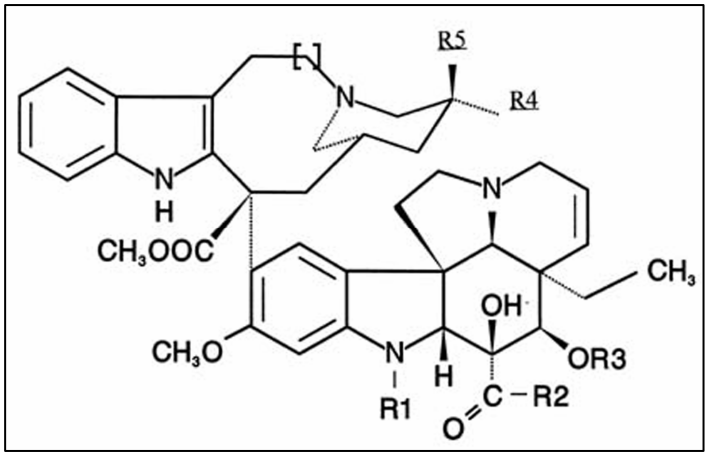


Figure 6 : Structure chimique de base des *Vinca* alcaloïdes.

A forte concentration, ces agents réduisent voire suppriment le contenu en microtubules des cellules en culture et empêchent la polymérisation de la tubuline purifiée *in vitro.* La plupart des *Vinca* alcaloïdes se lie à la sous unité β du dimère de tubuline au niveau d'une région spécifique de l'extrémité plus des microtubules, appelé site de liaison *Vinca* (Jordan *et al.*, 2004) (figure 7). Seule la vinblastine se lie à la fois à la tubuline soluble et à la tubuline polymérisée. La liaison avec la tubuline soluble est rapide et réversible et est à l'origine d'un changement conformationnel de

la tubuline. Les bases structurales de la liaison de la vinblastine au niveau des tubulines solubles ont été étudiées afin de déterminer le site de liaison de cette molécule (Gigant *et al.*, 2005). D'autres agents anticancéreux tels que les cryptophycines et les dolastatines ainsi que des herbicides, des antifungiques, des antiparasitaires et même certains antipsychotiques agissent par un mécanisme similaire (Kavallaris *et al.*, 2001).

La vinblastine et la vincristine ont été isolées des feuilles de la *Catharantus roseus* (Pervenche de Madagascar). Leurs propriétés antimitotiques ont été découvertes à la fin des années 1950. La vinorelbine, la vindésine et la vinflunine sont des molécules semi-synthétiques qui ont été développées plus tard et sont classées en molécule de 2ème génération.

Même si l'effet de tous ces agents à faible concentration est de diminuer la dynamique microtubulaire, il a été montré que la vinorelbine et la vinflunine affectaient cette dynamique de façon très différente que la vinblastine. Par exemple, la vinblastine inhibe fortement la vitesse et la longueur des phases de raccourcissements *in vitro*, alors que la vinorelbine et la vinflunine inhibent la vitesse et la longueur des phases de polymérisation (Ngan *et al.*, 2001). La morphologie du fuseau mitotique demeure néanmoins identique pour les cellules exposées à ces différents cytotoxiques (Ngan *et al.*, 2000). Des essais précliniques ont montré que la vinflunine possédait un effet anti tumoral relativement supérieur *in* vivo aux autres *Vinca* (Hill, 2001, Hill *et al.*, 1999, Kruczynski *et al.*, 2001).

Les *Vinca* alcaloïdes sont communément utilisés dans le traitement de plusieurs cancers tel le cancer du poumon, les leucémies, les lymphomes (Jordan *et al.*, 2004) (tableau 3).

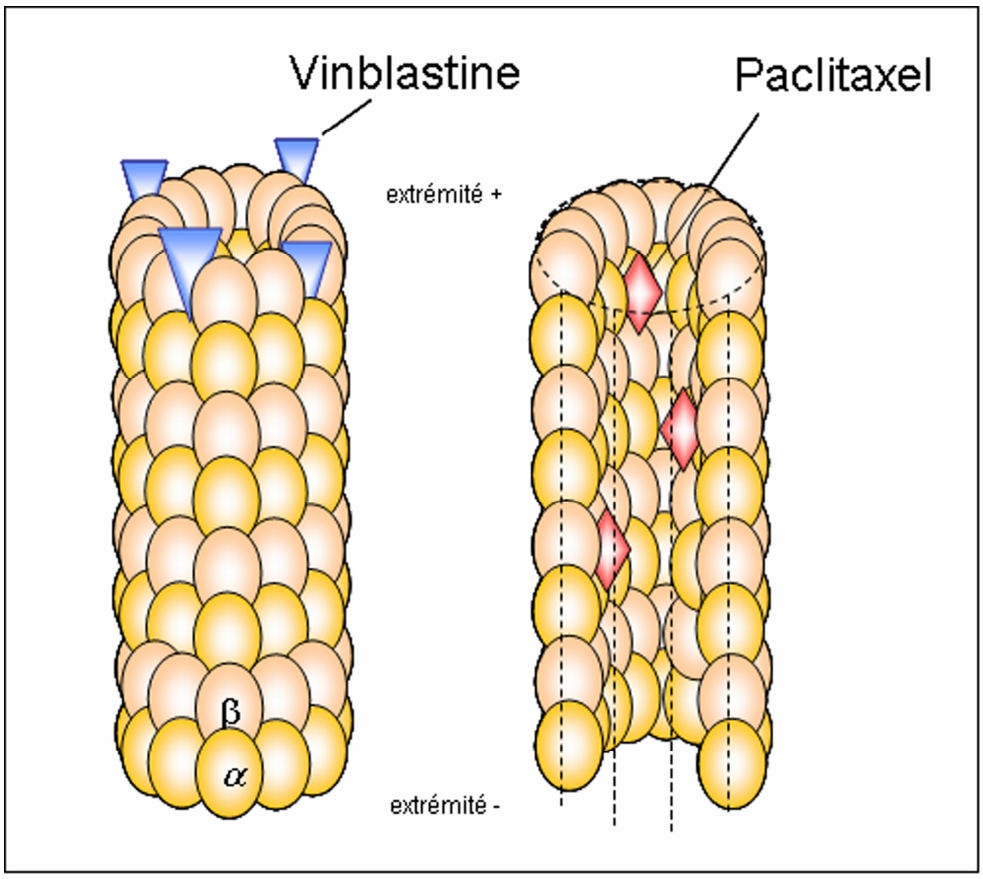


Figure 7 : Sites de liaison des agents anti-microtubulaires vinblastine et paclitaxel. Les molécules de vinblastine se lient au niveau de l'extrémité + des microtubules alors que le paclitaxel se lie au niveau de la surface interne des microtubules.

1.3.2. Les agents polymérisants

Les taxanes (paclitaxel et docetaxel, figure 8) induisent, à forte concentration, une polymérisation des microtubules *in vitro* et augmentent la fraction de tubulines polymérisée des cellules. Trois autres classes de cytotoxiques naturels, appartenant à cette même catégorie, ont récemment été découvertes et sont en cours de développement. Il s'agit des épothilones (Epo A et B), du discodermolide et de l'eleuthérobine.

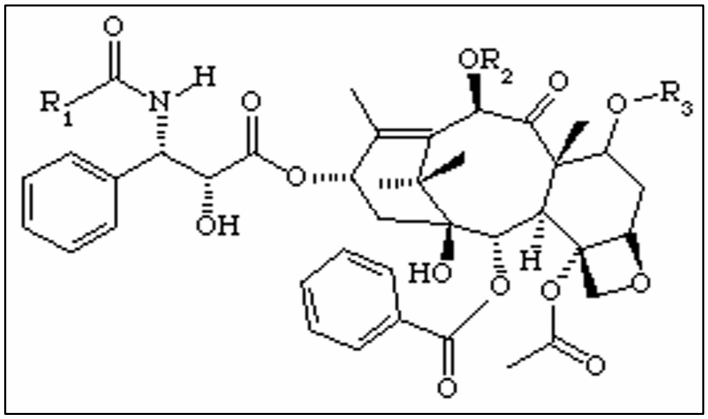


Figure 8 : Structure chimique de base des taxanes.

Le paclitaxel (Taxol®) fut le premier produit naturel décrit comme interagissant avec les microtubules. A l'origine, le paclitaxel a été isolé de l'écorce du *Taxus brevifolia* (If de l'Ouest). Le paclitaxel et son dérivé le docétaxel se lient à la β-tubuline incorporée aux microtubules au niveau du domaine des taxanes situé sur la face interne des microtubules (Jordan *et al.*, 2004) (figure 7). Cette liaison induit une forte stabilisation des contacts latéraux entre les protofilaments du microtubule (Amos *et al.*, 1999). Le paclitaxel et le docétaxel sont hautement hydrophobes et nécessitent une solubilisation respectivement par le Cremophor EL® ou le

polysorbate 80. Plusieurs dérivés de paclitaxel sont en cours de développement. Ils possèdent pour la plupart certains avantages par rapport aux autres taxanes comme notamment d'être efficaces sur des cellules résistantes au docétaxel ou au paclitaxel, de pouvoir traverser la barrière neuroendothéliale et d'être actifs sous forme oral (Kavallaris *et al.*, 2001). De ce fait, de nombreuses études cliniques sont en cours sur ces nouvelles molécules.

Les taxanes sont communément utilisés dans le traitement de plusieurs cancers tel le cancer du sein, de l'ovaire, et du poumon (Jordan *et al.*, 2004) (tableau 3).

Tableau 3 : Indications thérapeutiques des principaux agents pharmaceutiques anti-microtubulaires.

Domaine de liaison	Molécules pharmaceutiques	Nom commercial	Indications thérapeutiques principales
Vinca	Vinblastine	Velban®	Maladie de Hodgkin, lymphomes non hodgkinien, cancer des testicules
	Vincristine	Oncovin®	Leucémies aigues lymphoblastiques, lymphomes, neuroblastome, cancer du sein et du poumon
	Vinorelbine	Navelbine®	Cancer du poumon, du sein métastasé (controversé)
Taxane	Paclitaxel	Taxol®	Cancer de l'ovaire, du sein métastasé et du poumon
	Docetaxel	Taxotere®	Cancer du sein et du poumon

1.3.3. Mécanismes cellulaires de résistance

L'étude des mécanismes de résistance aux traitements ciblant les microtubules a fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années (Verrills

et al., 2005). Les mécanismes de résistance cellulaire à différents agents cytotoxiques peuvent être classés en trois catégories.

La première catégorie consiste en des modifications d'expression de gènes impliqués dans les étapes d'accumulation intracellulaire de la forme active de la molécule. Dans le cas du paclitaxel et du docetaxel, molécules prises en charge par la glycoprotéine Pgp, une surexpression de cette protéine est associée au phénotype de résistance à ces molécules (Casazza *et al.*, 1996). Ce phénomène est commun à d'autres molécules anti-cancéreuses ne ciblant pas les microtubules.

Le deuxième type de résistance consiste en des modifications quantitatives ou qualitatives des protéines cibles de l'agent thérapeutique (dans notre cas, les tubulines et les microtubules). Cette deuxième catégorie est donc spécifique selon l'agent thérapeutique utilisé.

Enfin, le troisième type de résistance, non spécifique de l'agent, concerne les modifications de la réponse cellulaire au stress induite par la molécule. Cela concerne des modifications des protéines intervenant dans la reconnaissance ou la réparation des lésions ou des protéines impliquées dans l'induction de la mort cellulaire. Par exemple, il a été montré que la présence d'une forme mutante de p53 au sein des cellules cancéreuses diminuait la sensibilité des cellules en modifiant l'induction de l'apoptose (Galmarini *et al.*, 2002, Galmarini *et al.*, 2001).

Au niveau des mécanismes spécifiques aux agents anti-tubulines, de nombreuses preuves de l'implication de mutations de tubulines (Hari *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006), de la composition en isotypes de tubulines (exemple de la tubuline classe III (Dumontet *et al.*, 2005, Ferlini *et al.*, 2005, Hari *et al.*, 2003, Mozzetti *et al.*, 2005, Seve *et al.*, 2005, Seve *et al.*, 2006, Urano *et al.*, 2006)) et de protéines liés aux microtubules (exemple de MAP4 (Kavallaris *et al.*,

2001, Zhang *et al.*, 1998)et de Tau (Rouzier *et al.*, 2005)) ont été mises en évidence. L'ensemble de ces phénomènes de résistance aurait potentiellement deux mécanismes communs d'action qui seraient la perturbation de la dynamique microtubulaire et/ou la diminution de l'affinité des agents anti-microtubulaires pour les microtubules. Ceci est illustré par le cas de l'isotype de classe III de la β-tubuline. Même si des études *in vitro* faites à partir de tubulines purifiées ont montré un lien entre le pourcentage de β-tubuline classe III et la dynamique microtubulaire (Panda *et al.*, 1994), aucune étude *in vivo* n'a à ce jour pu démontrer clairement l'implication de cet isotype dans la dynamique microtubulaire (Kamath *et al.*, 2005). Il a alors été émis l'hypothèse que, au sein de la cellule, l'isotype de classe III entraînerait le recrutement d'autres protéines ayant un effet compensateur de son propre effet intrinsèque sur la dynamique. Ceci résulterait en un encombrement stérique diminuant l'affinité des agents anti tubulines pour les microtubules. Egalement la tubuline beta III semble avoir une conformation plus rigide et donc moins sensible aux changements conformationnels induits par les agents anti tubulines (Derry *et al.*, 1997). Tout cela laisse supposer que la modification de la dynamique microtubulaire ne serait pas l'élément indispensable pour induire une résistance aux agents ciblant les tubulines au sein des cellules.

D'autres travaux ont montré l'implication d'autres molécules cytosqueletiques telle que la γ-actine dans les phénotypes de résistances aux anti-microtubules (Verrills *et al.*, 2006, Verrills *et al.*, 2006).

1.4. Composés et processus cellulaires pouvant influencer la dynamique des microtubules

Par analogie avec l'action des agents exogènes cilbant les microtubules, des altérations de composés cellulaires affectant la dynamique des microtubules peuvent contribuer au mauvais fonctionnement du fuseau microctubulaire. Le taux de tubulines polymérisables, les propriétés des différents isotypes, les modifications post-traductionnelles ainsi que l'intervention de protéines stabilisantes ou déstabilisantes des microtubules illustrent l'influence de certains composés cellulaires sur la dynamique des microtubules.

1.4.1. Taux d'hétérodimères polymerisables

Certains paramètres de la dynamique des microtubules tels que la polymérization, la durée des phases de croissance/de décroissance, le pourcentage de temps passé en décroissance et la fréquence de catastrophes sont dépendants directement de la concentration en hétérodimères polymérisables de tubulines (Chretien *et al.*, 1995, Walker *et al.*, 1988). Walker *et al.* ont montré notamment qu'en augmentant la concentration d'hétérodimères de tubulines *in vitro*, ils diminuaient la fréquence de catastrophes et la durée des phases de raccourcissements (Walker *et al.*, 1988). A l'inverse, en utilisant des solutions purifiées de tubulines, d'autres auteurs décrivent que la concentration en tubulines polymérisables influencent le taux de nucléation mais que la vitesse d'élongation et la fréquence de catastrophes sont insensibles aux variations de concentration en tubulines (Caudron *et al.*, 2000). Aucune étude n'a encore montré un lien entre le

taux d'hétérodimères polymérisables et la dynamique microtubulaire au sein de cellules vivantes.

1.4.2. Composition isotypique

In vitro, la composition en isotypes de β-tubuline des microtubules est clairement impliquée dans leur dynamique et ce notamment pour l'isotype classe III de β tubuline. En effet, un enrichissement de cet isotype provoque une augmentation de la dynamique des microtubules *in vitro* (Lu *et al.*, 1994, Panda *et al.*, 1994). Les microtubules assemblés à partir d'hétérodimères de tubuline α/βIII sont considérablement plus dynamiques que les microtubules constitués de tubulines α/βII ou α/βIV ou que les microtubules constitués d'un mélange isotypique. De plus, l'augmentation de la proportion de tubulines α/βII dans un mélange α/βII-α/βIII supprime la dynamique microtubulaire. Cependant, des études menées dans des cellules vivantes montrent, qu'à l'état de base, peu de différences de dynamicité microtubulaire sont observées lors d'expériences de surexpressions d'isotypes donnés (Kamath *et al.*, 2005) et aucune autre étude menée sur cellules vivantes n'a redémontré les effets observés *ex cellulo.*

Une étude menée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré l'implication de la composition en isotypes d'α-tubuline (en particulier l'isotype αIII) dans la dynamique des microtubules purifiés *in vitro* (Bode *et al.*, 2003).

1.4.3. Modifications post-traductionnelles des tubulines α et β

Sauf l'acétylation, les modifications post-traductionnelles telles que la détyrosination/tyrosination, la polyglutamylation et la polyglycylation sont localisées aux niveaux des domaines C-terminaux (Westermann *et al.*, 2003).

Beaucoup d'études sur différents modèles cellulaires ont montré que les microtubules les plus stables, c'est-à-dire ayant une dynamique très faible, sont ceux possédant des α-tubulines acétylées. Cependant, il semble clair que cette acétylation n'est pas la cause de cette stabilité mais plutôt une conséquence (Rosenbaum, 2000). Deux enzymes deacétylases d'histones, HDAC6 et SIRT2, sont décrites comme ayant des fonctions de tubulines déacétylases (Southwood *et al.*, 2006).

Dans beaucoup d'organismes eucaryotes, une tyrosine conservée du domaine C-terminal de l'α-tubuline est supprimée de façon post-traductionnelle. Le rôle fonctionnel du cycle de tyrosination/détyrosination de la tubuline reste flou. Des modèles de cellules en culture possédant une faible activité de la tubuline tyrosine ligase (TTL) ne présentent pas de phénotypes associés évidents. Cependant, des modèles murins knock-out pour la TTL meurent de façon précoce à cause d'une perturbation du développement neuronal (Erck *et al.*, 2005). La détyrosination de l'α-tubuline, comme l'acétylation, est présente en particulier sur les microtubules stabilisés et cela apparaît encore une fois comme étant une conséquence plus qu'une cause de l'augmentation de la longévité de ces microtubules détyrosinés (Walden *et al.*, 1989, Webster *et al.*, 1987).

L'analyse génétique de la polyglycylation des tubulines chez le *Tetrahymena* (protozoaire cilié non pathogène) démontre les fonctions essentielles de cette modification dans l'organisation des axonèmes, dans la motilité cellulaire et la

cytokinèse (Thazhath *et al.*, 2002). Cette modification, à la fois présente sur l'α- et sur la β-tubuline, est également associée aux microtubules les plus stables et influence de façon causale la stabilité et/ou la fonction de l'axonème (Redeker *et al.*, 1994).

La polyglutamylation de l'α-tubuline est connue pour être présente dès le début de la différenciation des cellules nerveuses alors que la polyglutamylation de la β-tubuline est retrouvée tout au long du processus de différenciation (Audebert *et al.*, 1994). La polyglutamylation peut influencer la liaison entre certaines MAPs et les microtubules (Bonnet *et al.*, 2001). L'injection d'anticorps dirigés contre les formes polyglutamylées de tubulines indique un rôle important pour cette modification dans la stabilité des centrioles (Million *et al.*, 1999).

La phosphorylation des tubulines par différents types de kinases a été étudiée en détail mais aucune conclusion précise n'a pu être établie puisque ces kinases phosphorylent également beaucoup d'autres substrats, une considération importante prouvant la nécessité d'effectuer des tests de phosphorylations sur un système *ex cellulo* de tubulines/microtubules purifiées. Une étude intéressante menée a montré que CdK1 phosphorylait la β-tubuline *in vitro* et *in vivo*. Cette phosphorylation se déroule au niveau de la sérine 172 de la β-tubuline, un site bien conservé selon les espèces (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006).

1.4.4. Exemples de protéines accessoires des microtubules

La dynamique microtubulaire est régulée au cours du cycle cellulaire par un équilibre entre les activités de protéines stabilisantes et déstabilisantes (Cassimeris, 1999, Itoh *et al.*, 2004). Les Microtubules Associated Proteins (MAPs) sont classiquement considérées comme des protéines stabilisantes par la suppression

des catastrophes microtubulaires. Les protéines Op18/Stathmine et Kin I sont quant à elles des exemples de protéines déstabilisantes. Ces dernières déstabilisent les microtubules en augmentant la fréquence des catastrophes.

1.4.4.1. Les protéines stabilisantes des microtubules

Dhamodharan et *al.* ont démontré que MAP2 inhibait l'instabilité dynamique des microtubules en diminuant les vitesses et longueurs des phases de croissance et de raccourcissement et les fréquences de catastrophe ainsi qu'en augmentant le pourcentage de temps passé en pause (Dhamodharan *et al.*, 1995). MAP2 est localisée le long des microtubules de façon hétérogène en formant des zones à haute densité, ce qui apparaît être important dans sa fonction d'inhibition de la dépolymérisation des microtubules (Itoh *et al.*, 2004).

MAP4 est la MAP la plus prédominante des cellules mammifères non neuronales. MAP4 augmente la polymérisation des microtubules par sa liaison aux extrémités C-terminales de l'α- et de la β-tubuline (Ookata *et al.*, 1995). Hasan et al. ont également montré qu'il existait un variant de MAP4 (MAP4-SP) spécifique des cellules neuronales et qui possédait une activité stabilisante des microtubules diminuée par rapport au variant ubiquitaire de MAP4 (MAP4-LP) (Hasan *et al.*, 2006).

STOP (stable tubule-only polypeptide) est un facteur de résistance à la dépolymérisation des microtubules induite par le froid. Plusieurs auteurs ont démontré que, tant que les microtubules étaient associés à STOP, ils étaient résistants au traitement par le nocodazole et devenaient détyrosinés (Job *et al.*, 1987, Margolis *et al.*, 1990).

TACC3 est un facteur diminuant la dynamique des microtubules au niveau de l'extrémité plus, permettant ainsi la stabilisation du fuseau microtubulaire (Gergely *et al.*, 2003).

ch-TOG/XMAP215 semble jouer un rôle essentiel dans l'organisation du fuseau. En effet, des cellules Hela ayant une délétion de ch-TOG/XMAP215 sont incapables d'un alignement correct des chromosomes au moment de la métaphase (Gergely *et al.*, 2003). Ces cellules sont néanmoins capables éventuellement de finir leur mitose et d'entrer en interphase avec un contenu aberrant d'ADN.

L'implication de protéines de la famille des CLIP (cytoplasmic linker protein) et de celle des CLASP (CLIP-associated proteins) dans la régulation de la dynamique des microtubules a été récemment revue (Galjart, 2005). Les protéines de la famille CLIP, tel que CLIP-170, sont clairement impliquées dans la stabilisation des microtubules (Carvalho *et al.*, 2004) en favorisant le sauvetage de microtubules (Arnal *et al.*, 2004, Komarova *et al.*, 2002). CLIP-170 est une protéine cytoplasmique impliquée dans les interactions microtubules-endosomes et dans le contrôle de la dynamique micortubulaire. CLIP-170 est située au niveau des extrémités en croissance des microtubules et est colocalisée avec la dynactine, la protéine EB1 (Goodson *et al.*, 2003, Lansbergen *et al.*, 2004, Sheeman *et al.*, 2003) et avec IQGAP1 qui est elle-même située au niveau du front de migration des cellules (Fukata *et al.*, 2002, Noritake *et al.*, 2005). Le rapprochement des extrémités croissantes des microtubules avec le front de migration par ces interactions induit une polarisation du réseau microtubulaire. Les CLASP tels que CLASP1 et CLASP2 stabilisent également les microtubules en favorisant les événements de pause et en limitant ceux de croissance/décroissance. Ils permettent également l'interaction avec EB1 et avec le cortex cellulaire (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005).

1.4.4.2. Les protéines déstabilisantes des microtubules

Op18/stathmine interagit et séquestre les hétérodimères de tubulines solubles ce qui conduit à une dépolymérisation des microtubules (Curmi *et al.*, 1997, Jourdain *et al.*, 2004). Une surexpression d'un mutant dominant négatif de la stathmine induit des anomalies dans la séparation des chromosomes (Brattsand *et al.*, 1994).

Kin I est une sous-famille de l'ensemble des protéines motrices kinésines. Celles-ci sont directement liées aux extrémités plus des microtubules. Elles provoquent l'augmentation de la fréquence de catastrophes en perturbant les lisaisons inter-protofilaments qui acquièrent une conformation plus relâchée (Desai *et al.*, 1999). Les Kin I semblent aider à l'établissement et au maintien de la fixation microtubules-kinétochores au moment de la capture des chromosomes par les microtubules.

MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) appartient également à la sous-famille des kinésines et régule la dynamique des microtubules au moment de la mitose. MCAK est responsable de l'augmentation de la dépolymérisation des microtubules qui ne sont pas encore liés aux kinétochores. De ce fait, MCAK est indispensable à l'attachement et à l'alignement des chromosomes au cours de la métaphase et ce (Maney *et al.*, 2001). MCAK pourrait également permettre la dépolymérisation des microtubules lorsque les chromosomes migrent vers les pôles au cours de l'anaphase (Maney *et al.*, 2001).

L'intérêt porté à Tau vient de son rôle critique dans le développement et le maintien de l'état de différenciation neuronal et de son implication dans la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives. En condition normale, Tau accomplie ses fonctions en se liant aux microtubules et en régulant efficacement leur stabilité et leur dynamique de croissance et décroissance. Tau augmente le taux de

polymérisation et diminue de façon très importante la fréquence de catastrophes et la vitesse de dépolymérisation (jusqu'à 30 fois moins) (Trinczek *et al.*, 1995). La diminution importante du taux de catastrophes des microtubules par Tau semble être indépendante de sa capacité à augmenter la vitesse de polymérisation. Tau génère donc des microtubules partiellement stabilisés mais toujours dynamiques (Drechsel *et al.*, 1992). Cet état stabilisé des microtubules est perturbé par la phosphorylation de Tau par la MAP2 kinase qui diminue l'affinité de Tau pour les microtubules (Drechsel *et al.*, 1992).

1.4.4.3. p53 comme régulateur des protéines accessoires

Certains auteurs ont également montré que les cellules possédant la forme mutante de p53 ont des modifications spécifiques au niveau de la polymérisation de la tubuline, de l'expression de la β-tubuline de classe II, de classe IV, des protéines MAP4, STOP, survivine et FHIT. Ceci a permis de supposer que p53 pouvait participer à la régulation de la composition et de la fonction des microtubules. Des perturbations au niveau de p53 génèrent des mécanismes complexes au niveau des microtubules et ceci pourrait favoriser l'apparition du phénotype de résistance aux agents ciblant les microtubules (Galmarini *et al.*, 2003).

1.4.4.4. Séquence mitotique

Se basant sur les activités et les localisations de l'ensemble de ces protéines stabilisantes et déstabilisantes, un modèle potentiel d'inactivation et d'activation séquentielle de ces protéines au cours du cycle cellulaire peut être proposé (Cassimeris, 1999, Zhai *et al.*, 1996) (figure 9).

Au moment de l'entrée en mitose, CdK1 est active et peut directement phosphoryler certaines protéines accessoires. Cette phosphorylation inhibe certaines protéines stabilisantes en les détachant des microtubules. Ce déplacement permet à la protéine katanine d'accéder aux microtubules et de découper ceux-ci. L'inactivation des protéines stabilisantes combinée avec le découpage par la katanine des microtubules expliquerait alors la forte diminution de la masse microtubulaire observée au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Ensuite, la masse des microtubules est fortement augmentée ce qui semble être une conséquence de l'inactivation tardive d'Op18/stathmine induite par sa phosphorylation (Larsson *et al.*, 1997, Larsson *et al.*, 1995). L'inactivation de certaines protéines stabilisantes entraîne l'activation de protéines déstabilisantes telle MCAK ce qui induit une augmentation du taux de catastrophes. Ceci permet d'obtenir une dynamique microtubulaire élevée indispensable pour effectuer la capture et l'alignement des chromosomes. Ensuite, au cours de la progession anaphasique les protéines stabilisantes ainsi que la stathmine sont réactivées et un réseau microtubulaire interphasique se remet alors en place dans les 2 cellules filles. La sortie de mitose nécessite l'intervention de la phosphatase PP2A (protein phosphatase 2A) considérée comme une protéine suppresseur de tumeur (Lechward *et al.*, 2001). PP2A inhibe l'activité de CdK1 par plusieurs mécanismes différents (Millward *et al.*, 1999, Minshull *et al.*, 1996). Cette inactivation est indispensable afin de permettre le retour à des niveaux d'activités interphasiques de la protéine CdK1 et des protéines associées aux microtubules cibles de cette kinase. De plus, il a été montré que la protéine PP2A déphosphorylait Op18/stathmine induisant ainsi sa réactivation et la stabilisation des microtubules (Tournebize *et al.*, 1997).

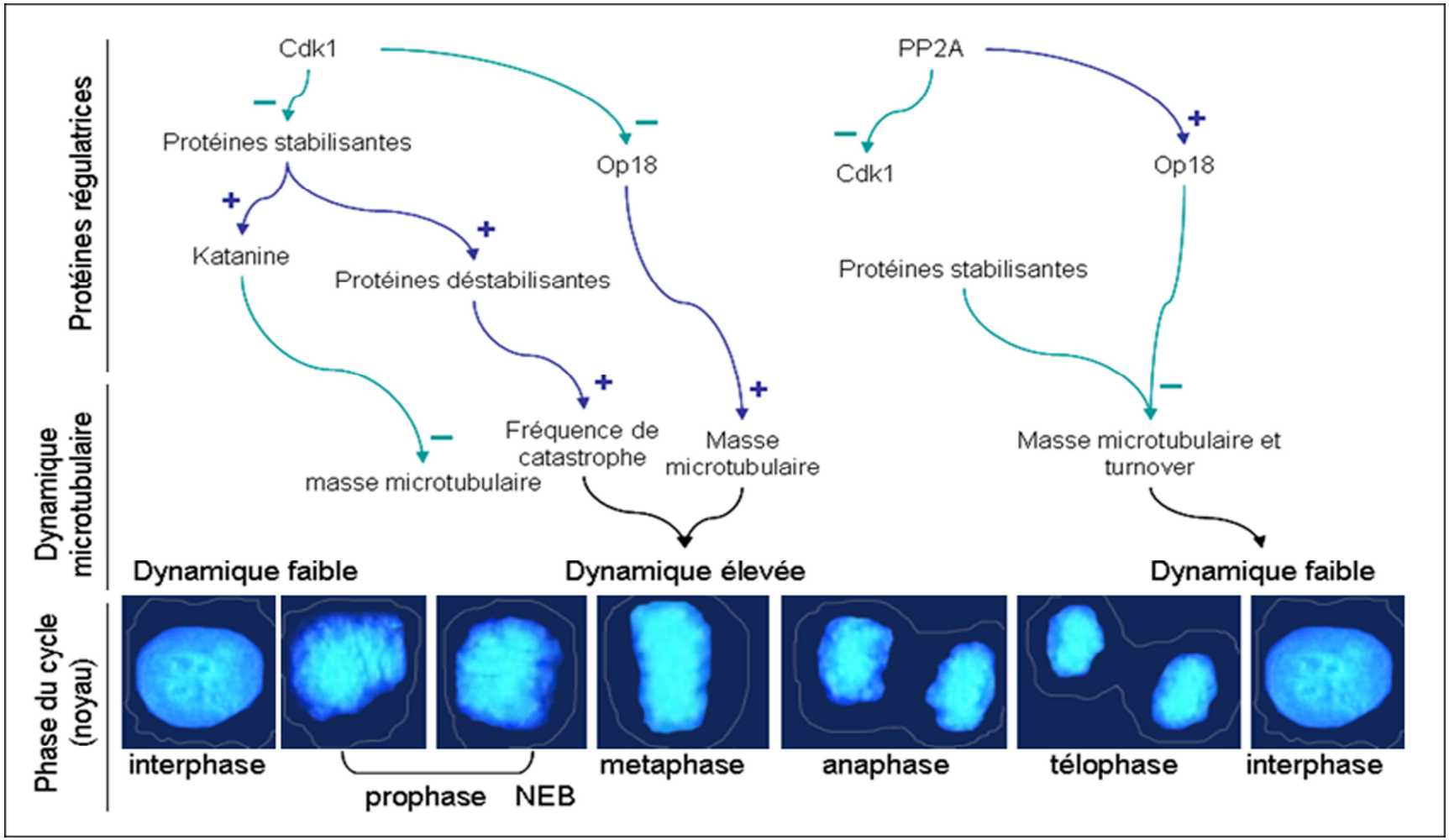


Figure 9 : Séquence mitotique d'intervention de différentes protéines accessoires régulatrices de la dynamique microtubulaire. NEB : Nuclear Envelope Breakdown (rupture de l'enveloppe nucléaire). Fléche verte : inhibition, flèche bleu : activation ou augmentation.

1.5. Dynamique des microtubules, aneuploïdie, instabilité chromosomique et cancer

Des modifications positives ou négatives de la dynamique des microtubules peuvent entraîner un arrêt en G2/M ou une mitose aberrante et de ce fait être responsable du statut aneuploïde des cellules cancéreuses. L'aneuploïdie consiste en une perturbation du nombre et/ou de l'intégrité des chromosomes d'une cellule. L'instabilité chromosomique (CIN) est le fait qu'au sein d'une population cellulaire issue d'une même cellule cancéreuse progénitrice toutes les cellules n'ont pas le même contenu chromosomique.

1.5.1. Aneuploïdie, CIN et cancer

Toutes les lignées cancéreuses sont décrites comme étant aneuploïdes et présentant des CIN, alors que de nombreuses lignées de cellules non tumorales sont diploïdes et sans CIN. Des travaux ont montré que des tumeurs de carcinomes de colon possédaient un haut degré de CIN (Huang *et al.*, 1996). Ceci semble être commun aux cancers du colon, du sein, du poumon, de la prostate et du cerveau (Pihan *et al.*, 1998). Il est également important de souligner le fait que l'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie apparaissent simultanément à un stade précoce du développement tumoral, suggérant que les CIN ne sont pas seulement une conséquence tardive de l'aneuploïdisation (Visscher *et al.*, 1996). Beaucoup d'auteurs ont suspecté un rôle de l'aneuploïdie dans la tumorogénèse (Duesberg *et al.*, 1999, Feinberg *et al.*, 1995, Lasko *et al.*, 1991, Pihan *et al.*, 1999, Storchova *et al.*, 2004). Des chromosomes seraient perdus ou gagnés d'une manière

stochastique et les cellules ayant un set de chromosomes avantageux pour la croissance cellulaire seraient positivement sélectionnées.

1.5.2. Aneuploïdie, CIN et ségrégation des chromosomes

Il a été décrit 3 mécanismes différents pouvant conduire à l'aneuploïdie (Pihan *et al.*, 1999, Storchova *et al.*, 2004). L'aneuploïdie peut résulter de mauvaises ségrégations sporadiques des chromosomes au sein d'une cellule tumoral progénitrice conduisant à une population ayant une certaine stabilité et homogénéité du contenu en ADN perpétuées par des divisions mitotiques normales. Une seconde hypothèse consiste à considérer la polyploïdisation comme étape obligatoire précédent l'aneuploïdie. Une perte progressive de chromosomes du progéniteur original polyploïde générerait des cellules aneuploïdes. Le troisième mécanisme permettant d'obtenir des cellules aneuploïdes implique l'acquisition d'un défaut permanent dans la capacité de séparer convenablement les chromosomes des cellules. Cela pourrait également entraîner des modifications perpétuelles du nombre de chromosomes à chaque division cellulaire, définition même de l'instabilité chromosomique. Seul ce mécanisme explique à la fois l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique des cellules tumorales. Cette théorie expliquerait également l'extrême variabilité des caryotypes et contenus en ADN observés entre et au sein des tumeurs solides.

1.5.3. Ségrégation des chromosomes et perturbation de la dynamique du fuseau mitotique

Une misségrégation permanente des chromosomes peut être due à plusieurs phénomènes tels l'attachement des kinétochores, la migration et séparation des

chromatides. La plupart de ces phénomènes ont un point commun qui est la perturbation de la dynamique des microtubules. Le phénomène de “tapis roulant” et l’instabilité dynamique sont nécessaires à l’attachement correct aux kinétochores et pour tirer les chromatides vers les pôles (Inoue, 1997, Margolis *et al.*, 1998). Il paraît clair que des modifications de la dynamique des microtubules peuvent provoquer une malformation et/ou un dysfonctionnement du fuseau mitotique et être la cause d’une incapicité permanente à ségréger correctement les microtubules. Ceci est illustré par l’action des molécules anti microtubules connues pour induire des cellules aneuploïdes (Chen *et al.*, 2002) par des perturbations de la mitose (arrêt en G2/M et/ou mitose aberrante).

2. MISE EN CONFORMATION DES TUBULINES

Les protéines chaperonnes ont pour rôle de protéger leurs protéines cibles contre leur aggrégation et leur destruction par le protéasome, et de permettre la mise en conformation des protéines immatures. Des expériences de surexpression des sous-unités individuelles de α- ou β-tubulines menées dans les organismes pro- et eucaryotes ont systématiquement conduit à une aggrégation de ces tubulines. De plus, comme nous l'avons précédemment cité, les tubulines possèdent une variété d'interactions avec de nombreuses protéines et nous pouvons supposer que celles-ci doivent être préservées de liaisons non souhaitées au cours de la mise en conformation.

2.1. Voie de mise en conformation des tubulines et formation de l'hétérodimère αβ-tubuline

La mise en conformation des sous-unités α- et β-tubulines et l'obtention de l'hétérodimère de tubulines incorporable dans les microtubules sont des mécanismes complexes nécessitant l'intervention d'au moins 7 protéines possédant une activité de chaperonnes et d'au moins 2 protéines régulatrices de cette mise en conformation. A ce jour, il n'y a pas de résultat montrant une spécificité pour un ou des isotype(s) particulier(s) de tubulines. Le mécanisme décrit ici est donc commun à tous les isotypes.

2.1.1. Séquence de prise en charge

La préfoldine va intervenir la première en se liant aux peptides de tubulines en cours d'élongation, suivie de la protéine chaperonine cytosolique CCT (cytosolic containing TCP-1) de 800 kDa, et enfin interviennent les 5 Tubulin Binding Cofactors (TBCs) nommés de A à E (Lopez-Fanarraga *et al.*, 2001, Tian *et al.*, 1995, Tian *et al.*, 1995) (figure 11). Le rôle de la préfoldine est de rapprocher les tubulines et la chaperonine CCT est ainsi permettre la formation du complexe CCT/tubulines (Vainberg *et al.*, 1998). Suite à un échange ATP-ADP, la CCT subit un changement conformationnel allostérique (Rommelaere *et al.*, 1993). Suite à cette étape, TBC-A et TBC-B se lient respectivement à la β- et à l'α-tubuline dans le but de constituer les pools de monomères solubles de tubulines (Tian *et al.*, 1995). TBC-D et TBC-E peuvent se lier aux sous-unités de tubulines générées par les cofacteurs TBC-A et TBC-B ou plus directement aux tubulines issues du complexe CCT/tubulines. TBC-D

interagit avec la β-tubuline et TBC-E se lie à l'α-tubuline. Une fois formés, les complexes TBC-D/β-tubuline et TBC-E/α-tubuline, l'hétérodimère de tubuline pourra être produit en présence du dernier cofacteur TBC-C, de GTP et de magnésium. Cette hétérodimère possède alors la conformation tridimensionnelle nécessaire à la polymérisation des microtubules (Fontalba *et al.*, 1993). Le complexe TBC-C/TBC-D/TBC-E stimule l'activité GTPasique de la tubuline native, ce qui résulte en l'hydrolyse d'une molécule de GTP en GDP et en la libération de l'hétérodimère polymérisable par le supercomplexe TBC-C/TBC-D/TBC-E/α-tubuline/β-tubuline. De plus, TBC-C/TBC-D/TBC-E peuvent se lier à l'hétérodimère polymérisable pour reformer ce supercomplexe et individuellement TBC-D et TBC-E peuvent reformer les complexes TBC-D/β-tubuline et TBC-E/α-tubuline provoquant ainsi la dissociation de l'hétérodimère (Lopez-Fanarraga *et al.*, 2001). Ce cycle de réaction en retour pourrait être considéré comme un mécanisme de « contrôle qualité » servant à réguler la quantité d'hétérodimères produits. Certains cofacteurs intervenant dans la mise en conformation des tubulines permettent donc à la fois la formation de l'hétérodimère mais aussi sa dissociation, suggérant que la mise en conformation des tubulines pourrait être un mécanisme régulant la dynamique des microtubules via la concentration en hétérodimères polymérisables.

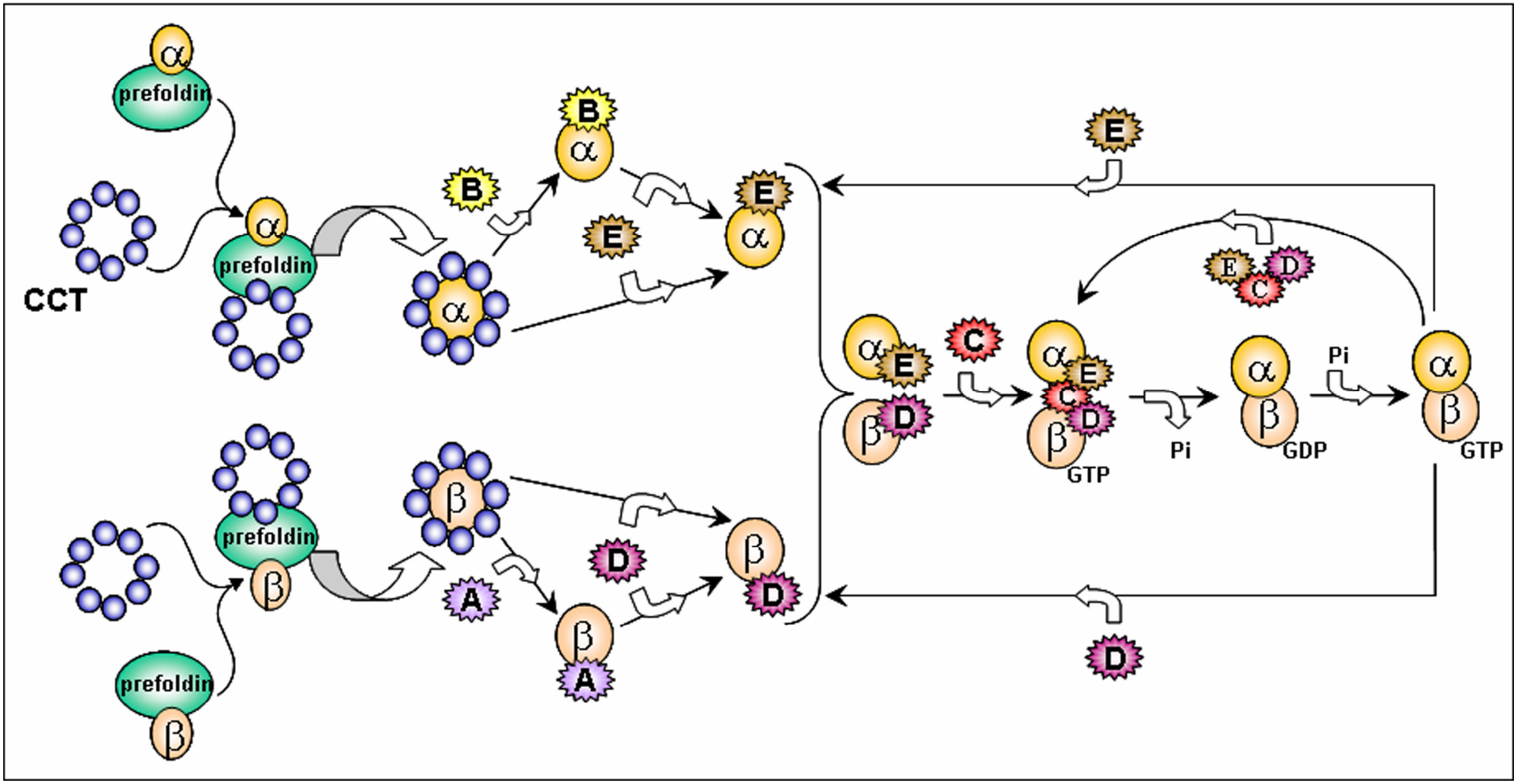


Figure 11 : Mise en conformation des tubulines : séquence de prise en charge de l'α-tubuline (α) et de la β-tubuline (β) par les différentes chaperonnes (préfoldine et CCT) et par les Tubulin binding Cofactors (A à E).

2.1.2. Les protéines chaperonnes

Les chaperonnes moléculaires sont des groupes de protéines permettant la mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées ou dénaturées.

2.1.2.1. La préfoldine

Vainberg et al. ont découvert une protéine chaperonne hétérohexamérique nommée préfoldine capable de capturer l'actine non conformée (Vainberg *et al.*, 1998). La préfoldine présente une structure semblable à « une pieuvre » dont les « tentacules » sont responsables des liaisons avec les protéines cibles telles l'actine et les tubulines (Vainberg *et al.*, 1998). La préfoldine se lie spécifiquement à la chaperonine cytosolique CCT et lui transfère ainsi les protéines cibles. La délétion du gène codant pour une sous-unité de la préfoldine chez *S. cerevisiae* induit un phénotype incluant des dysfonctionnements du réseau des filaments d'actines et de microtubules, phénotype similaire à celui observé lors de mutation de la CCT. Il a également été montré qu'en permettant la prise en charge des protéines cibles par la CCT, la préfoldine permettait leur mise en conformation dans un environnement très défavorable aux protéines non conformées (Simons *et al.*, 2004).

2.1.2.2. La CCT

La cytosolic chaperonin-containing t-complex polypeptide 1 (CCT) est une chaperonne moléculaire jouant un rôle important dans la mise en conformation de diverses protéines. On estime qu'il y aurait environ 15% de protéines totales nouvellement synthétisées dont la mise en conformation nécessite l'intervention de la CCT. L'actine et les tubulines α et β sont des exemples de protéines prises en

charge par la CCT. La CCT est composée de 8 sous-unités différentes formant un complexe en double boucle de 16-mer. La CCT se lie préférentiellement aux intermédiaires protéiques pseudo-conformés, alors que son orthologue chez *E. Coli* GroEL semble préférer les protéines très peu voire non conformées (Kubota, 2002). Une reconstruction tridimensionnelle de la CCT complexée avec la tubuline a permis de montrer que la CCT interagit avec les tubulines α et β par 5 sous unités différentes. L'interaction tubuline-CCT est géométriquement différente de l'interaction actine-CCT. La CCT agit cependant de façon identique pour effectuer la mise en conformation de ces protéines cibles (Llorca *et al.*, 2000). Des analyses moléculaires complémentaires ont suggéré que chaque sous-unité avait une fonction spécifique en plus de contribuer à une activité commune ATPasique. L'expression globale de la CCT dans des cellules de mammifères est indépendante de la croissance cellulaire mais chaque sous unité possède un schéma d'expression spécifique (Kubota, 2002).

2.1.3. LesTubulin Binding Cofactors (TBCs)

2.1.3.1. TBC-A

TBC-A fut le premier TBC découvert. Des résultats se basant sur l'analyse de l'expression de TBC-A dans des tissus murins ont montré une forte expression de celle-ci dans les testicules où il semble que l'expression de TBC-A soit associée à des perturbations microtubulaires au moment de la spermatogénèse (Fanarraga *et al.*, 1999). Rbl2p chez *S. Cerevisiae* (Archer *et al.*, 1998, Archer *et al.*, 1995) et Alp31 (Radcliffe *et al.*, 2000) chez *S. Pombe* ont été identifiés comme orthologues de TBC-A. Rbl2p, qui possède 20% d'homologie avec TBC-A, est capable de sauver

les cellules d'une surexpression létale de β-tubuline et est indispensable au déroulement normal de la méiose (Archer *et al.*, 1995). Un traitement au nocodazole provoquant l'arrêt en phase G2/M de *S. Cerevisiae* induit une augmentation de l'expression de Rbl2p (Velculescu *et al.*, 1997). Chez *S. Pombe*, Alp31 est nécessaire au contrôle de la polarité et semble être impliqué dans l'intégrité du réseau microtubulaire (Radcliffe *et al.*, 2000).

2.1.3.2. TBC-B

TBC-B est le dernier cofacteur identifié à ce jour (Tian *et al.*, 1997). Des orthologues de TBC-B ont été identifiés chez *S. Cerevisiae* (Alf1p) (Feierbach *et al.*, 1999) and chez *S. Pombe* (Alp11) (Radcliffe *et al.*, 2000). Ces 3 cofacteurs contiennent le domaine CLIP-170 également présent chez de nombreuses MAPs (Feierbach *et al.*, 1999, Tian *et al.*, 1997). Alf1p est capable de s'associer aux microtubules et cette localisation est dépendante du domaine CLIP-170. Une mutation de ce gène en combinaison avec une mutation du gène codant pour l'α-tubuline est létale. Une surproduction d'Alf1p provoque une mauvaise association de cette protéine avec l'hétérodimère de tubulines chez *S. Cerevisiae* (Tian *et al.*, 1997). L' orthologue Alp11 chez *S. Pombe* est essentiel à la viabilité cellulaire et sa surexpression provoque la mort des cellules (Radcliffe *et al.*, 2000). En utilisant la technique du double hybride, Vadlamudi et al. ont montré que TBC-B s'associe avec la kinase p21-activated kinase 1 (Pak1) (Vadlamudi *et al.*, 2005). Pak1 est impliqué dans l'organisation du cytosquelette en régulant la dynamique des microtubules. Pak1 phosphoryle directement TBC-B *in vitro* et *in vivo* au niveau des sérines 65 et 128, et est colocalisé avec TBC-B au niveau de microtubules nouvellement synthétisés et des centrosomes. Des mutations de TBC-B pour les sérines 65 et 128

entraînent une diminution de la polymérisation des microtubules. Une surexpression de TBC-B provoque une forte augmentation du nombre de MTOC (Vadlamudi *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été montré que la surexpression de TBC-B dans les cellules humaines provoquait une dépolymériation massive des microtubules. Les auteurs ont décrit que ce phénomène était du à la formation du complexe binaire TBC-B et TBC-E augmentant ainsi la capacité de ce dernier à dissocier les hétérodimères de tubulines. Ils ont également montré la formation d'un complexe ternaire composé de TBC-E, TBC-B et de l'α-tubline après dissociation de l'hétérodimère (Kortazar *et al.*, 2006).

2.1.3.3. TBC-C

TBC-C est capable d'induire la libération de l'hétérodimère de tubulines du complexe TBC-D/TBC-E/α-tubuline/β-tubuline. Chez les mammifères, TBC-C contient une séquence pouvant induire potentiellement l'adressage nucléaire de TBC-C, une séquence « leucine zipper » et 3 régions différentes riches en cystéine, en proline et en tryptophane probablement impliquées dans les interactions protéines-protéines. Un orthologue potentiel de TBC-C, Cin2p, a été identifié chez *S. Cerevisiae* (Tian *et al.*, 1999) et joue un rôle dans la formation du dimère de tubuline (Fleming *et al.*, 2000). Aucun orthologue de TBC-C n'a encore été identifié chez *S. Pombe*. La protéine de la rétinite pigmentaire 2 (RP2) est exprimée dans une grande variété de tissus eucaryotes et contient une région N-terminale semblable à la région C-terminale de TBC-C (30% d'identité). De la même façon que TBC-C, RP2 peut stimulée l'activité GTPasique de la tubuline en présence d'autres cofacteurs *in vitro* (Bartolini *et al.*, 2002). Une différence importante entre TBC-C et RP2 est leur localisation intracellulaire. RP2 est située au niveau de la face cytoplasmique de la

membrane plasmique grâce à une double acétylation au niveau N-terminal (Evans *et al.*, 2005).

2.1.3.4. TBC-D

Tian et al. ont purifié une protéine de 130 kDa intervenant dans la mise en conformation des tubulines (Tian *et al.*, 1995). TBC-D se lie à la β-tubuline pour former le complexe TBC-D/β-tubuline et ce en dissociant soit le complexe TBC-A/β-tubuline, soit le complexe CCT/β-tubuline, soit l'hétérodimère d'αβ-tubulines (réaction en retour) (Lewis *et al.*, 1996). La surexpression de TBC-D dans des cellules Hela (cellules epithéliales de carcinome du col utérin) entraîne la destruction complète du réseau microtubulaire (Martin *et al.*, 2000). Des expériences d'immunolocalisation ont montré que TBC-D et la β-tubuline étaient colocalisées dans toute la cellule. L'α-tubuline semble quant à elle rapidement éliminée, probablement via la dégradation par le protéasome. TBC-D ne semble pas être lié aux microtubules comme l'ont montré des tests effectués en immunocytochimie et des tests de polymérisation *in vitro* (Martin *et al.*, 2000). Des orthologues de TBC-D ont été identifiés chez *S. Cerevisiae,* Cin1p (Hoyt *et al.*, 1990) et chez *S. Pombe,* Alp1 (Radcliffe *et al.*, 1998). Cin1p est une protéine impliquée dans la ségrégation des chromosomes et dans la stabilité des microtubules. Une surexpression de Cin1p induite par l'activation d'un promoteur inductible provoque une augmentation de la sensibilité au benomyl, conduisant à une perte de fonctionnalité des microtubules (Radcliffe *et al.*, 1998). Chez *S. Pombe*, un mutant d'Alp1 provoque un nombre important de défauts tels que des mitoses anormales, une perte de la structure des microtubules, un mauvais positionnement du noyau, une polarité altérée et des divisions asymétriques. La surexpression d'Alp1 est létale pour les cellules sauvages

mais est sauvée par la cosurexpression de l'orthologue de la β-tubuline. Alp1 est colocalisée avec les microtubules interphasique et mitotique. De plus, Alp1 se lie et coprécipite avec des microtubules stabilisés par le paclitaxel. L'ensemble de ces résultats suggère que TBC-D semble avoir un rôle essentiel dans les processus dépendants des microtubules.

2.1.3.5. TBC-E

De la même façon que pour TBC-D et la β-tubuline, TBC-E se lie à l'α-tubuline provenant soit du complexe TBC-B/α-tubuline, soit du complexe CCT/α-tubuline, soit de l'hétérodimère d'αβ-tubulines (réaction en retour) (Lewis *et al.*, 1996). Les mêmes expériences de surexpression de TBC-E dans des cellules Hela ont également montré une destruction du réseau de microtubules polymérisés (Tian *et al.*, 1999). Des expériences de copolymérisation *in vitro* des microtubules ont montré une absence de colocalisation de TBC-E avec les microtubules. Pac2p chez *S. Cerevisiae* (Hoyt *et al.*, 1997) et Alp21 (ou Sto1) chez *S. Pombe* (Radcliffe *et al.*, 1998) (Grishchuk *et al.*, 1999) ont été identifiés comme orthologues de TBC-E. Pac2p est indispensable à la stabilité normale des microtubules et lorsqu'il est cosurexprimé avec l'α-tubuline, un complexe entre ces deux protéines peut être détecté (Vega *et al.*, 1998). Sto1 est un gène essentiel chez *S. Pombe* car il est impliqué dans la production de microtubules normaux et dans le maintien de la stabilité du fuseau mitotique. Le cytosquelette microtubulaire interphasique dans des cellules ayant une mutation de Sto1 est très fortement dégradé et lors de l'entrée en mitose le fuseau mitotique est incapable de se former entraînant ainsi une mort cellulaire (Radcliffe *et al.*, 1998).

2.1.3.6. La protéine E-like

Une nouvelle protéine dont la séquence est similaire au cofacteur E, la protéine E-like (El) a été identifiée (Keller *et al.*, 2005). Des expériences de surexpression d'El effectuées dans des cellules humaines Hela (cancer du col de l'utérus) ont eu pour conséquence la dissociation des hétérodimères polymérisables de tubuline et leur adressage vers le protéasome. La suppression de l'expression d'El dans ces mêmes cellules a induit une augmentation du pourcentage en microtubules stables modifiés post-traductionnellement par un mécanisme inconnu (Keller *et al.*, 2005). Cependant, El semble ne pas interagir avec les microtubules directement et ne semble pas avoir de fonctions dans la voie de mise en conformation des tubulines.

2.1.4. Les pathologies associées à la mise en conformation des tubulines

Dans de nombreuses maladies neurodégénérescantes les protéines cytosquelettiques ont des fonctions déficientes et ont tendance à s'aggréger. La neuropathie sensorielle mutilante avec paraplégie est une maladie très rare comportant à la fois des altérations autosomales dominantes et récessives. Une mutation au niveau du gène codant pour la sous unité δ de la CCT a été décrite comme étant associée à cette neuropathie dans des rats (Lee *et al.*, 2003). Une mutation dans le gène codant pour la sous unité ε de la CCT a été quant à elle associée à cette maladie chez des patients (Bouhouche *et al.*, 2006). Cette neuropathie a été la première maladie associée à des perturbations de la chaperonne CCT, ce qui a amené à nommer les maladies imputables aux

chaperonnes comme des « chaperonnopathies ». Schuller et al. ont montré l'implication de la CCT (et plus particulièrement de la sous unité ζ) dans l'accumulation de tubulines non conformées pour des pathologies tels qu'Alzheimer ou le syndrôme de Down (Schuller *et al.*, 2001). Une autre étude a permis d'étendre les observations et a montré que des anomalies d'expression de la CCT étaient présentes au moment des stades précoces du développement du cerveau dans le cas du syndrôme de Down (Yoo *et al.*, 2001).

TBC-E semble également être impliqué dans certaines neuropathies (Barral *et al.*, 2004). Des mutations de TBC-E sont responsables du syndrôme HRD (hypoparathyroïdisme, retard mental et déformation faciale) et du syndrôme de Sanjad-Sakati (hypothyroïdie congénitale, retard mental et statural, épilepsie, dysmorphie et anomalies des extrémités) et du syndrôme de Kenny-Caffrey (même symptôme que Sanjad-Sakati avec en plus ostéosclérose et infections récurrentes) (Parvari *et al.*, 2002). Des mutations de TBC-E chez la souris ont conduit à l'apparition progressive d'une neuropathie motrice (Martin *et al.*, 2002).

RP2, protéine similaire à TBC-C, est mutée chez des patients atteints de rétinite pigmentaire liée à l'X (XL-RP) qui consiste en une dégénérescence progressive de la rétine (Schwahn *et al.*, 1998).

2.2. Régulation de la mise en conformation des tubulines : Arl2 et PP2A

A ce jour, il a été identifié 2 protéines pouvant réguler l'action des intervenants de la mise en conformation des tubulines : la protéine ADP Ribosylation factor Like protein 2 (Arl2) et la protéine phosphatase 2A (PP2A). De plus, il a également été identifié que la protéine ADP Ribosylation factor Like protein 3 (Arl3) interagissait

avec la protéine RP2 considérée comme l'orthologue fonctionnel de TBC-C (Bartolini *et al.*, 2002, Evans *et al.*, 2005).

2.2.1. Arl2

2.2.1.1. La famille Arf

La famille des ADP ribosylation factors (Arf) est composée de GTPases régulatrices et monomèriques comprenant à ce jour 23 membres chez les mammifères et pouvant être divisée en un groupe Arf, un groupe Arf-like (Arl) et un groupe SARs (secretion-associated and Ras-related protein) (Boman *et al.*, 1995, Kahn *et al.*, 2006).

Arf a d'abord été découvert, purifié et défini fonctionnellement comme le cofacteur de la sous unité régulatrice et stimulatrice (Gs) de l'adenylyl cyclase nécessaire à la ribosylation de l'ADP catalysé par la toxine du choléra (Enomoto *et al.*, 1980, Kahn *et al.*, 1984). Peu de temps après, Arf fût identifié comme étant une protéine liée au GTP (Kahn *et al.*, 1986). Dés lors, les Arfs (Arf1 à 6) ont été identifiés comme régulateurs ubiquitaires du trafic membranaire et du métabolisme des lipides chez les cellules eucaryotes (Li *et al.*, 2004, Nie *et al.*, 2003). Les Arfs sont des protéines solubles qui peuvent se transloquer au niveau des membranes au moment de leur activation. Leur activation est déclenchée par l'échange du GDP lié par un GTP. L'inactivation a lieu grâce à l'hydrolyse du GTP lié. Le clonage et le séquençage du premier Arf (Sewell *et al.*, 1988) a montré que ces protéines étaient assez proches de la famille des Ras et de celle des sous unités α (protéines G hétérotrimérqiues) des GTPases laissant supposer l'existence d'un gène ancêtre

commun. Un haut degré de conservation des séquences des *Arfs* chez les eucaryotes (74% entre l'Homme et la levure) a été décrit (Murtagh *et al.*, 1992).

Le critère de dénomination de nouveaux Arfs est fonctionnel et seules les protéines pouvant servir à la fois de cofacteurs de la toxine du choléra, sauver la délétion létale *arf1-arf2-* chez *S.Cerevisiae* et activer directement la phospholipase D ont été nommées Arf. Par conséquent, un gène essentiel cloné chez *D.Melanogaster* codant pour une protéine relativement proche des Arfs (50-60% d'identité) mais ne présentant aucune de ces activités fût nommé *arf-like* (Tamkun *et al.*, 1991) et des orthologues de ce gène identifiés chez de nombreuses autres espèces fûrent dénommés *Arf-like 1* (*Arl1*) (Breiner *et al.*, 1996, Kahn *et al.*, 1992). Il faut remarquer que si les critères de dénominations des Arf sont fonctionnels, le seul critère de dénomination des Arls est structurel. Les protéines étant proches structurellement des Arfs sans posséder leurs fonctions seront dénommées Arls. Par exemple, Arl2 possède 45% d'homologie avec Arf1 et n'a aucune des activités biochimiques précédemment attribué aux Arfs (Kahn *et al.*, 1992). Par conséquent, les Arls ne constituent pas un groupe cohérent en termes de fonction et de phylogénie.

Avec moins de 30% d'homologies avec les Arls et les Arfs, les SARs (secretion-associated and Ras-related protein) sont à peine plus proches de cette famille que des autres familles de GTPases. Cependant, ils possèdent des fonctions attribuées aux Arfs telles le recrutement de protéines membranaires dans la formation des vésicules de sécrétion. Mais les SARs ne présentent aucune autre fonction des Arfs citées précédemment. SAR1 fût un des premiers membres de la famille des Arfs à être séquencé. Chez les mammifères, deux orthologues très proches (90% d'homologies entre eux) ont été identifiés (Kuge *et al.*, 1994).

2.2.1.2. La protéine Arl2

Arl2 est une petite protéine de 21 kDa assez particulière au sein de la grande famille des Arfs. Arl2 ne possède pas de fonction de myristoylation du N-terminal (Clark *et al.*, 1993), peut se lier rapidement, et indépendamment de la présence de phospholipides, au GTP et s'associe à la mitochondrie (Sharer *et al.*, 2002).

Des études génétiques ont montré une implication d'Arl2 dans la régulation des microtubules. Des preuves biochimiques directes du rôle d'Arl2 dans le processus complexe de la mise en conformation des tubulines ont été apportées par Bhamidipati et al. (Bhamidipati *et al.*, 2000). Le cofacteur TBC-D se lie à Arl2 uniquement s'il est compléxé au GDP. Chez les mammifères, la liaison directe entre Arl2 et TBC-D induit une inhibition spécifique de l'activité de dissociation des hétérodimères de tubulines par TBC-D et également une inhibition de la reformation du supercomplexe TBC-C/TBC-D/TBC-E/α-tubuline/β-tubuline (figure 12). Tous les autres résultats obtenus sur d'autres espèces montrent l'implication des orthologues d'Arl2 dans l'assemblage et le fonctionnement des microtubules. Cin4p, orthologue d'Arl2 chez *S. Cerevisiae*, est codé pas un des trois gènes non essentiels participant à la réponse à différents stress anti-microtubulaire (tel le benomyl (agent fongicide désagrégant les microtubules) ou le froid) (Hoyt *et al.*, 1997). De la même façon, alp41, orthologue d'Arl2 chez *S. Pombe*, fût identifié comme un gène essentiel nécessaire au bon fonctionnement des microtubules et à la croissance polarisée (Radcliffe *et al.*, 2000).

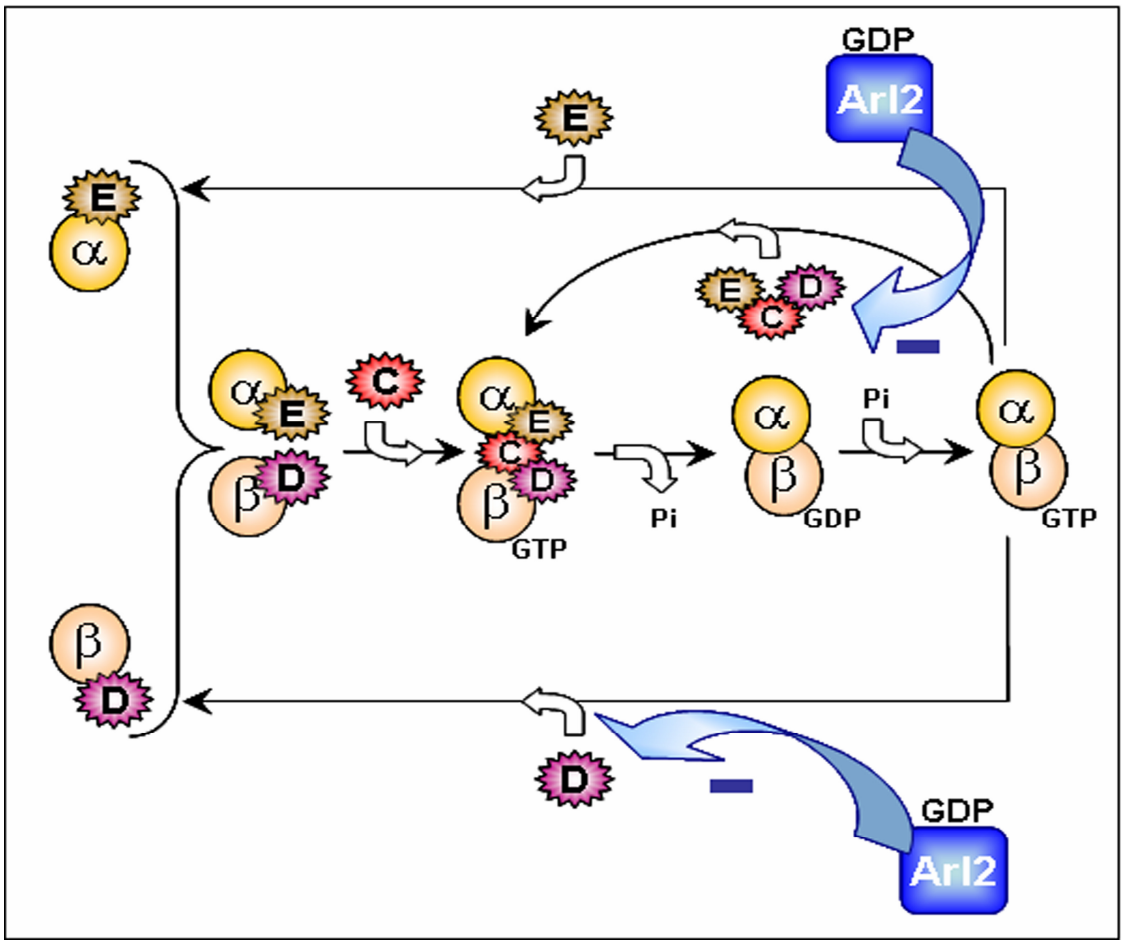


Figure 12 : Rôles d'Arl2 dans la mise en conformation des tubulines. Arl2-GDP se lie directement et spécifiquement à TBC-D (D) et inhibe l'activité de dissociation de l'hétérodimère de tubuline par ce cofacteur. Par sa liaison avec TBC-D, Arl2 empêche également la reformation du supercomplexe TBC-C/TBC-D/TBC-E/α-tubuline/β-tubuline.

Une récente étude a montré qu'Arl2 semblait être localisée au niveau des centrosomes de différentes cellules de mammifères et ce durant chaque phase du cycle (Zhou *et al.*, 2006). De plus, une surexpression d'un mutant inactif pour l'activité GTPasique d'Arl2 (équivalent à une surexpression de la forme Arl2-GTP) entraînait une désagrégation des microtubules et un arrêt du cycle cellulaire en mitose (Zhou *et al.*, 2006). Cependant, l'effet de la protéine Arl2 sur la dynamique des microtubules n'a pas à ce jour été évalué.

D'autres partenaires d'Arl2 ont été identifiés. BART (binder or Arl2, 20kDa) fût décrit comme le premier effecteur d'Arl2. BART se lie uniquement à Arl2-GTP avec une haute affinité et est localisé partiellement dans les mitochondries (Sharer *et al.*, 2002). Par des tests *in vitro*, le complexe BART/Arl2-GTP peut se lier à la protéine adenine nucleotide transporter 1 (ANT1) située sur la face interne de la membrane mitochondriale Par fractionnement de cellules provenant de cerveaux bovins, seulement 5 à 10 % du contenu en Arl2 est mitochondrial, le reste étant cytosolique (Sharer *et al.*, 2002). Plus récemment, un complexe de 300 Kda composé de TBC-D, de l'hétérotrimérique phosphatase PP2A (protein phosphatase 2A) et de la totalité de la fraction cytosolique d'Arl2 a été décrit (Shern *et al.*, 2003). La présence d'Arl2 au sein d'un complexe multimérique est très inhabituelle pour une GTPase et laisse supposer de nouveaux modes de régulation. La capacité d'Arl2 à lier le GTP mais pas le GDP au sein de ce complexe est clairement inhibée. Ceci permet de supposer que le contenu en Arl2 au sein de la cellule est majoritairement sous sa forme liée au GDP. Les activités de TBC-D (formation et dissociation de l'hétérodimère de tubuline) sont fortement inhibées également au sein du complexe. Enfin, il semblerait que l'activité de phosphatase de PP2A complexée à TBC-D/Arl2-GDP soit diminuée par rapport à PP2A libre (Shern *et al.*, 2003).

2.2.2. PP2A

La protéine phosphatase 2A est une sérine/thréonine phosphatase. Sa structure complexe permet d'assurer différentes fonctions. Cette protéine est composée d'une sous unité structurale PR65/A et d'une sous-unité catalytique c (PP2Ac) de 36 kDa. L'hétérodimère PR65/A/PP2Ac s'associe à différents types de sous unités régulatrices pour former une holoenzyme hétérotrimerique. Le type de sous unité régulatrice composant ce complexe détermine la liaison à des substrats spécifiques et adresse l'holoenzyme à des compartiments cellulaires déterminés. L'activité de PP2Ac peut être modulée par une phosphorylation réversible au niveau de la tyrosine 307 et par méthylation au niveau de la leucine 309 en C-terminal (Lechward *et al.*, 2001). De nombreuses études menées sur cette phosphatase ont montré qu'elle était impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la réplication de l'ADN (Janssens *et al.*, 2005), le cycle cellulaire (Minshull *et al.*, 1996), l'apoptose (Van Hoof *et al.*, 2003), la transformation oncogénique et est considérée comme suppresseur de tumeur (Janssens *et al.*, 2005).

Plus particulièrement, plusieurs études ont rapporté l'implication de PP2A dans la transition G2/M grâce à une régulation négative de la protéine Cdk1 qui forme un complexe avec la cycline B (Lechward *et al.*, 2001) (Millward *et al.*, 1999, Minshull *et al.*, 1996). Au niveau de l'apoptose, PP2A active les protéines pro-apoptotiques et inhibent les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Lechward *et al.*, 2001, Van Hoof *et al.*, 2003). L'inhibition de PP2A par différents inhibiteurs tels l'acide okadaïque, la calyculine A, les microcistines et les nodularines induit de nombreux types de cancers (MacKintosh *et al.*, 1994) (Fujiki *et al.*, 1993, Gehringer, 2004). L'importance de l'activité de PP2A est également mise en évidence par le fait que les antigènes tumorigène small et middle T du papovavirus

SV40 peuvent se substituer aux sous unités B régulatrices et altérer l'induction de l'apoptose et contribuer ainsi à la pathogénécité virale et à l'oncogénèse associée à ce virus (Cegielska *et al.*, 1994, Pallas *et al.*, 1990, Sontag *et al.*, 1999).

Des mutations affectant les gènes de PP2A ont été retrouvées dans des carcinomes du poumon, du sein, du colon (Calin *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 1998) mais aussi dans beaucoup d'autres tumeurs solides incluant des carcinomes du col de l'utérus, de l'ovaire, gastriques. Elles présentent des délétions de la région q23 du chromosome 11 codant pour une sous unité de PP2A (Calin *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 1998).

Parmi les nombreuses cibles intéressantes de PP2A, nous retiendrons par exemple les protéines associées aux microtubules MAP2 (Sanchez *et al.*, 1996), et Tau (Schild *et al.*, 2006, Tar *et al.*, 2004, Tar *et al.*, 2006) ainsi que le facteur de transcription suppresseur de tumeur p53 (Dohoney *et al.*, 2004, Messner *et al.*, 2006). Egalement, la protéine PP2A est impliquée dans la régulation de la voie de signalisation mTOR intégrant les signaux dérivés de facteurs de croissance et de nutriments avec le contrôle de la synthèse protéique par la kinase p70S6K. PP2A déphosphoryle et inhibe p70S6K conduisant à une diminution de la synthèse protéique (Peterson *et al.*, 1999).

2.2.2.1. PP2A et phospho-p53

Il a été montré que PP2A déphosphorylait p53 au niveau de différents sites tels que la sérine 15 (Messner *et al.*, 2006) ou la sérine 37 (Dohoney *et al.*, 2004).

La protéine suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription labile qui est activé et stabilisé en réponse à différents stress cellulaires comme les traitements chimiothérapeutiques décrits précédemment. La régulation de l'activité

de p53 par sa phosphorylation est très controversée. Il a été suggéré que la phosphorylation de résidus spécifiques de p53 pouvait affecter son activité de transcription et/ou son affinité pour différents groupes de gènes permettant ainsi une réponse sélective des cellules aux stress (Brooks *et al.*, 2003, Jimenez *et al.*, 1999). Par exemple, au sein du noyau, une phosphorylation de la sérine 15 permet d'augmenter l'interaction de p53 avec les facteurs de transcription CBP et PCAF (Dumaz *et al.*, 1999, Lambert *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999).

2.2.3. Arl2 et PP2Ac sont extrêmement bien conservées

Dans le but de souligner l'importance de certaines protéines intervenant dans la voie de mise en conformation des tubulines, nous avons effectué l'alignement des séquences protéiques en utilisant le logiciel Clustalw (Infobiogen). Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Contrairement aux différents TBCs qui présentent moins de 20 % d'homologie, les séquences de PP2Ac et d'Arl2 sont très conservées des mammifères à la levure. Les séquences de PP2Ac et de ces orthologues présentent au moins 70% d'homologie entre l'Homme, la souris et les levures *S.cerevisiae* et *S.Pombe*. Les séquences d'Arl2 et de ces orthologues chez ces mêmes espèces présentent un minimum de 50 % d'homologie. Par conséquent, une séquence consensus a été proposée pour ces 2 protéines et l'on peut en déduire que ces protéines doivent assurer des fonctions essentielles à la biologie cellulaire pour avoir été ainsi conservées au cours de l'évolution.

Tableau 4 : Caractéristiques principales et homologie de PP2Ac, d'Arl2 et des Tubulin Binding Cofactors (TBCs).

Noms	Numéro d'accession (ARNm/prot)	Taille	Localisation chromosomique	% homologie			Séquences consensuelles
				Homme_ Souris	Homme_ S.Pombe	Homme_S. Cerevisiae	
PP2Ac	NM_002715 NP_002706.1	36 kDA (309 aa)	5q31.1	100	78	74,1	.....:.....:....::::+:: ::+D+W:E+L::C::L:E::V::LC:+A:+:L::E:NV+:++:P VT+CGD+HGQFHDL+ELF:IGG::PD+NYLFMG DYVDRGY+SVETV:+LVA:K+RYP:RITILRGNH ESRQITQVYGFYDECLRKYG:ANVWK:FT+LF DY:P+TAL++::IFCLHGGLSP+I+++D+:R:L+R:Q EVPHEGPMCDLLWSDPDDR+GWGISPRGAG +TFGQDISE+FNH+N+L:L::RAHQLVMEG++W: H+:+VVTIFSAPNYCYRCGNQAAI+E:D++::::FL Q+DP++R:GEP:++R+TPDYFL
Arl2	NM_001667 NP_001658.1	21 kDa (184 aa)	11q13	96,7	52,7	29,3	MGLL+I+:+:K:+++E:R:L:LGLDN+GK+TI+++:::+ D...:+:++PT:GF:I:+L+::+::::+WD:GGQ+:LR::W:N YF++T:::IW++D+:+::R:::+::+L+:L++++:+::...:::+:: +NK:D+:+++S.....:::+.::L::::::+:++:+::+S++TG+:::: :+++L::+::::.::::..
TBC-A	NM_004607 NP_004598.1	13kDa (108 aa)	5q14.1	92,6	24,1	22,6	-
TBC-B	NM_001281 NP_001272.2	27kDa (244 aa)	19q13.11-q13.12	88,9	26,5	21,7	-
TBC-C	NM_003192 NP_003183.1	39 kDa (346 aa)	6pter-p12.1	75,4	X	11,2	-
TBC-D	NM_005993 NP_005984.	133 kdA (1190 aa)	17q25.3	81,8	16,98	11,4	-
TBC-E	NM_003193 NP_003184.1	59 kDa (527 aa)	1q42.3	73,7	17,8	17	-

L'alignement des séquences protéiques est faite grâce au logiciel Clustalw (Infobiogen): http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl . L'acide aminé présent est majoritaire dans au moins 20% (.), ou 40% (:), ou 60% (+) des cas. X signifie qu'il n'y a pas d'alignement possible. Il n'y a pas de séquences consensuelles disponibles pour les TBC.

2.3. Conclusion

L'ensemble des données que nous venons de décrire suggère qu'Arl2 pourrait constituer un lien entre le contrôle de l'assemblage des tubulines, la dynamique microtubulaire, la régulation de la division cellulaire et l'induction de l'apoptose. Nous avons revu les facteurs régulant les tubulines et la dynamique micotubulaire. Alors que l'implication de protéines associées aux microtubules dans la régulation de la dynamique microtubulaire a été bien étudiée, quelques données indirectes nous conduisent à penser que la mise en conformation des tubulines pourrait constituer un point de départ dans la régulation de cette dynamique. Afin de nous aider à mieux comprendre les mécanismes de chimiorésistances responsables de l'échec thérapeutique des traitements actuels, il nous parait utile d'identifier de nouveaux composants cellulaires pouvant influencer des paramètres tels que la dynamique microtubulaire ou l'expression de protéines clés comme PP2A et p53.

3. MODELE D'ETUDE : LE CANCER DU SEIN

3.1. Le cancer du sein

Le sein est un organe constitué d'un tissu graisseux qui repose sur les muscles pectoraux. Chez la femme, sa fonction est la lactation. Il comporte 15 à 25 lobules faits de glandes mammaires responsables de la sécrétion du lait. Celui-ci est conduit par les canaux galactophores vers le mamelon. Les seins sont soutenus par la peau et un tissu fibreux qui pénètrent à l'intérieur de la glande mammaire, participant ainsi à leur maintien (figure 13).

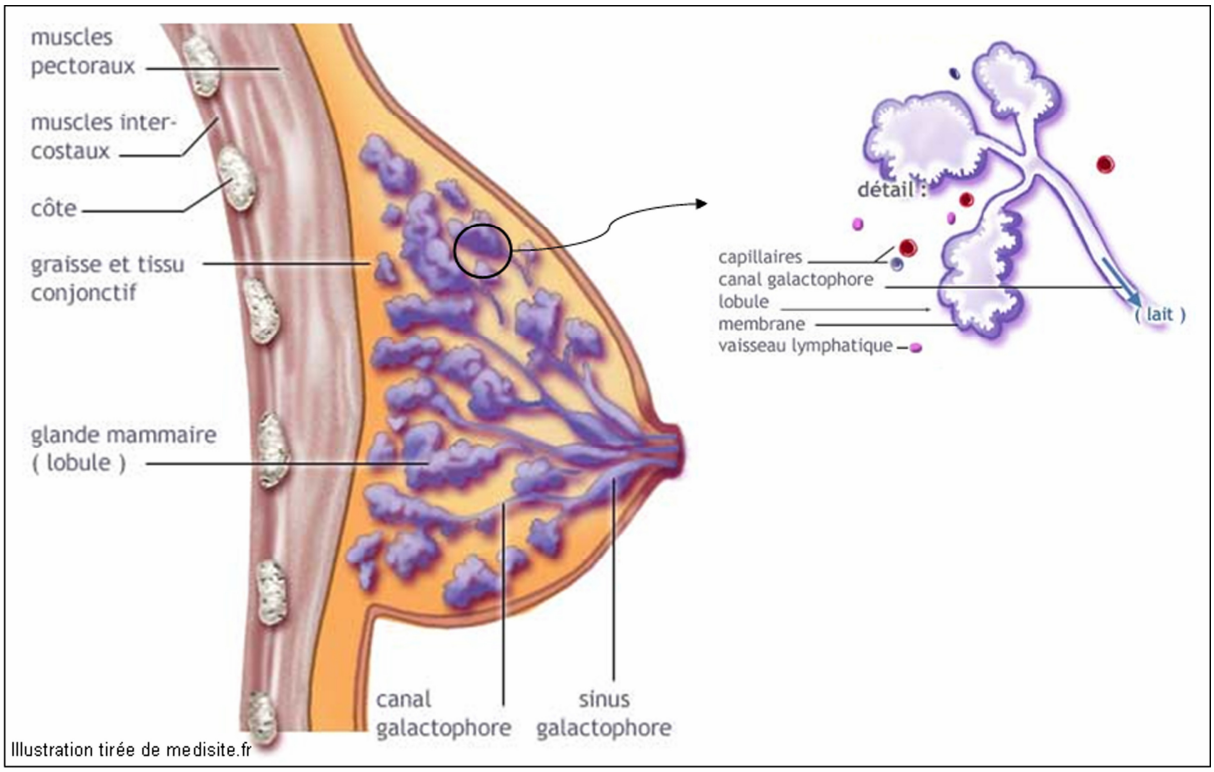


Figure 13 : Schéma anatomique du sein et détail d'une glande mammaire normale.

« Le cancer est une tumeur liée à la prolifération à la fois anarchique et indéfinie d'un clone cellulaire conduisant à la destruction du tissu originel, à

l'extension locale, régionale et générale de la tumeur et à la mort de l'individu en l'absence de traitement. » (Définition extraite du *Dictionnaire de Médecine Flammarion*). Le cancer du sein est donc une prolifération anormale des cellules dans la glande mammaire. C'est le plus souvent un carcinome issu de l'épithélium des glandes proprement dites ou de leurs canaux. Comme la plupart des cancers, le cancer du sein se décrit comme une maladie polygénique et multifactorielle. Différentes anomalies perturbent l'expression de certains gènes contrôlant des processus régulateurs tels que la prolifération, la différenciation, le cycle cellulaire, la réparation des lésions de l'ADN, l'apoptose, l'adhésion, la motilité, l'angiogenèse… Ces perturbations peuvent conduire à l'initiation de l'oncogenèse, à l'instabilité génétique et chromosomique, à l'aneuploïdie et à la progression vers un phénotype de plus en plus malin et invasif.

3.1.1. Epidémiologie du cancer du sein

Les estimations les plus récentes indiquent que plus de 1 million de nouveaux cas de cancers du sein surviennent dans le monde chaque année. En 1998, 412 000 décès ont été attribués au cancer du sein, soit 1,6% de la totalité des décès. Le cancer du sein occupe donc la première place des cancers touchant la femme dans le monde.

En France, cette pathologie occupe également la première place et on a dénombré 42 000 nouveaux cas par an (soit 36% des cancers féminins), 11 600 décès par an (soit 20% des décès par cancer chez la femme), et 40% des décès prématurés avant 65 ans (données du Ministère de la Santé, 2 juillet 2003). Ce cancer est rare avant 30 ans et sa fréquence d'apparition augmente avec l'âge pour

atteindre un pic entre 60 et 65 ans. La probabilité pour une femme française d'avoir un cancer du sein au cours de sa vie est de 10%.

L'incidence du cancer du sein a augmenté au cours des deux dernières décennies. Entre 1980 et 2000, le nombre de nouveaux cas a pratiquement doublé, avec un taux d'évolution annuel moyen de +2,42% (données du Ministère de la Santé, 2004). Durant la même période, le taux de mortalité des patientes atteintes d'un cancer du sein est resté relativement stable, avec un taux d'évolution annuel moyen de 0,42%. Cette stabilisation reflète probablement l'amélioration des thérapies ainsi que la détection plus précoce de la maladie, permettant de traiter plus tôt la tumeur. Le cancer du sein peut aussi survenir chez l'homme, cette forme représentant environ 1% de la totalité de ce type de cancer.

Les cancers du sein héréditaires représentent 5 à 10% de l'ensemble des cancers mammaires. Deux gènes majeurs de prédisposition héréditaire au cancer du sein ont pu être identifiés : *BRCA1* et *BRCA2*. Toutefois, d'autres gènes apparaissent également impliqués dans le développement de ces cancers (*TP53, ATM*…). Par opposition, 90 à 95% des cancers du sein sont sporadiques, c'est-à-dire qu'ils surviennent spontanément et ne semble pas être liés à un risque héréditaire. Il est également intéressant de noter qu'environ 70% des cancers du sein sont hormono-dépendants. Ces tumeurs expriment alors les récepteurs aux œstrogènes et/ou les récepteurs à la progestérone et leur prolifération cellulaire est sous la dépendance des œstrogènes.

3.1.2. Différents types de cancer du sein

Il existe différents types de cancer du sein. 95 % des cancers du sein se développent à partir des cellules des canaux (cancer canalaire) et des lobules

(cancer lobulaire) galactophores. On les appelle des adénocarcinomes. Lorsque les cellules cancéreuses se trouvent uniquement à l'intérieur des canaux ou des lobules, sans que la tumeur ait infiltré le tissu qui les entoure, on parle alors de cancer in situ. Ils sont le plus souvent découverts lors d'un dépistage systématique (mammographie ou examen des seins par le médecin). Lorsque les cellules cancéreuses ont infiltré le tissu qui entoure les canaux et les lobules, on parle de cancer ou de carcinome infiltrant.

3.1.2.1. Le cancer canalaire

Le cancer canalaire (carcinome intracanalaire, carcinome intraductal) est défini par une prolifération de cellules épithéliales malignes de type canalaire, confinées à l'intérieur des structures canalaires et pouvant s'étendre aux lobules et à l'épiderme mamelonnaire. Ce carcinome peut être multifocal voir bilatéral dans 8 à 10 % des cas. Ce cancer possède différents aspects morphologiques. La classification de cette morphologie est basée sur l'architecture des lésions :

- massives : la lumière des canaux est entièrement comblée par les cellules tumorales,

- papillaires : prolifération végétant dans la lumière avec projections papillaires de taille variable,

- micropapillaires ("crampon") composées de petites touffes ou micro papilles intraluminales,

- cribriformes (polyadénoides) avec polarisation des cellules reconstituant des cavités glanduliformes dans les massifs tumoraux intracanalaires,

-en comédons ou comédocarcinome caractérisé par la présence d'une nécrose centrale abondante.

L'hétérogénéité architecturale de ces lésions intracanalaires aboutit fréquemment à un type mixte pour la même lésion. Les différentes formes de lésions ne constituent pas un élément pronostique.

Les modes de détection du cancer du sein canalaire sont :

- tumeur palpable ou visible radiologiquement,
- écoulement mamelonnaire,
- lésion cutanée du mamelon (maladie de Paget),
- présence de microcalcifications.

3.1.2.2. Le cancer lobulaire

Le cancer lobulaire est plus rare. Il représente environ 5 à 10 % des cancers du sein. Il est plutôt considéré comme un facteur de risque de développer un cancer du sein que comme un cancer en lui-même. Il peut également évoluer vers un cancer infiltrant. La définition de ce cancer correspond à une lésion caractérisée par la présence d'acini distendus, comblés par une prolifération de petites cellules arrondies, relativement régulières et peu cohésives. Le carcinome lobulaire infiltrant est souvent de diagnostic difficile à la mammographie et constitue l'essentiel des échecs de cette technique. Environ 1 cancer du sein sur 10 est occulte à la mammographie et ce en particulier dans des seins denses (seins riches en tissus conjonctifs et glandulaires par opposition aux seins graisseux et peu denses). La distinction peut être difficile avec les hyperplasies lobulaires atypiques, d'où le terme de néoplasie lobulaire utilisé par certains pour désigner ces deux entités.

Le cancer lobulaire constitue une lésion préménopausique, de découverte fortuite, sans traduction clinique ou radiologique, souvent multicentrique (50 à 70%) et bilatérale (30%). Le cancer lobulaire est histologiquement plus homogène que le

carcinome canalaire, mais certaines variations morphologiques existent telles que la présence de cellules pléomorphes.

3.1.2.3. Les cancers du sein infiltrants

Les cancers infiltrants (canalaires ou lobulaires) peuvent se propager vers les ganglions ou vers d'autres parties du corps. Les ganglions les plus souvent atteints par les cellules du cancer du sein se trouvent sous les bras, au niveau des aisselles ; on les appelle les ganglions axillaires. Le traitement des cancers infiltrants repose sur un traitement local (chirurgie, radiothérapie) et associe dans certains cas un traitement général (chimiothérapie, hormonothérapie).

3.1.3. Système de classification

Il existe une évolution vers une classification basée sur des critères à valeur pronostique, essentiellement sur l'évaluation du grade nucléaire et la présence ou non de nécrose ; l'architecture étant secondaire. En 1997, la Conférence de Consensus de Philadelphie (Schwartz 1997) recommande plutôt de mentionner les éléments suivants dans le compte rendu d'anatomie pathologique que de privilégier une classification donnée :

- grade nucléaire,
- nécrose,
- polarisation nucléaire,
- architecture.

Le grade nucléaire est défini en trois grades :

- bas grade nucléaire : noyaux monomorphes, dont la taille est d'environ 1,5 à 2 globules rouges (ou noyau de cellule canalaire normale), la chromatine est fine, les nucléoles sont peu visibles, il existe peu de mitoses.

- haut grade nucléaire : noyaux pléomorphes, de taille supérieure à 2,5 globules rouges (ou noyau de cellule canalaire normale), la chromatine est hétérogène, les nucléoles sont proéminents, les mitoses fréquentes.

- grade nucléaire intermédiaire : pour les noyaux dont les caractéristiques ne permettent pas de les classer dans les deux grades précédents.

Le système de classification TNM (taille, nombres de ganglions envahis, métastase) de l'Union internationale contre le cancer (UICC) est le mode de classification le plus communément utilisé dans le cas des tumeurs solides. La plupart des tumeurs sont classifiables par ce système. Chaque type de tumeur possède ses propres critères d'évaluation du TNM. Un individu classé T1N0M0 aura une tumeur de moins de 2cm, sans atteinte ganglionnaire ni métastases (voir tableau 5).

Tableau 5 : Le système de classification TNM

Dimension de la tumeur T	T1	tumeur < 2 centimètres
	T2	dimension comprise entre 2 et 4 centimètres
	T3	tumeur > 4 centimètres
	T4	extension aux structures adjacentes
Atteinte des ganglions N	N0	pas de signe d'atteinte ganglionnaire régionale
	N1	1 ganglion homolatéral < 3 centimètres
	N2	- 1 ganglion homolatéral de dimension 3 à 6 centimètres
		- ganglions homolatéraux, controlatéraux ou bilatéraux < 6 centimètres
	N3	ganglion(s) > 6 centimètres
Métastases M	M0	absence de métastases
	M1	présence de métastases

L'indice de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) est également un système de classification des plus anciens et des plus utilisés. Il est basé sur l'évaluation de trois critères : la différenciation, le degré d'anisocaryose (taille hétérogène des noyaux au sein d'une tumeur), et le compte de mitoses. Ce système a permis d'établir 3 grades de malignité : I de bas grade, II de grade intermédiaire et III de haut grade (voir tableau 6). Initialement proposé pour les carcinomes canalaires infiltrants, il est actuellement recommandé de l'appliquer sur toutes les variétés histologiques (sauf les carcinomes médullaires).

Tableau 6 : Le système de classification de Scarff-Bloom-Richardson (SBR)

Formation de tubes (degré de différenciation des cellules de cancer du sein)	
Prédominante	1
Modérée	2
Faible ou nulle	3
Anisocaryose	
Discrète	1
Modérée	2
Marquée	3
Mitoses	
1 / quelques champs	1
2-3 / majorité des champs	2
> 2-3 / majorité des champs	3
Score Total	
3, 4, 5	grade I
6, 7	grade II
8, 9	grade III

3.1.4. Autres pathologies

3.1.4.1. La Maladie de Paget

La maladie de Paget du sein est caractérisée par des lésions eczématiformes et des ulcérations du mamelon. Il existe un désaccord quant au mode de progression de cette maladie. Néanmoins, il est plausible que l'on soit en présence d'une forme particulière de carcinome canalaire qui prend naissance au niveau des canaux galactophores principaux et qui atteint secondairement le mamelon. Cette forme particulière de carcinome canalaire est de pronostique favorable en raison des signes cliniques souvent précoces. Néanmoins, une atteinte du mamelon peut parfois s'associer à un carcinome canalaire infiltrant de stade avancé et ayant pris naissance dans la profondeur du sein.

3.1.4.2. Autres carcinomes

Le carcinome médullaire est un sous type rare de carcinome canalaire infiltrant (1%) possédant un meilleur pronostique que les autres carcinomes canalaires infiltrants. Il possède une morphologie très distincte. Il est bien limité et constitué de nappes de cellules peu différenciées à haut grade nucléaire dans un stroma peu abondant et avec infiltration lymphoïde.

Le carcinome mucineux (ou colloïde) atteignant préférentiellement la femme âgée (>60 ans) est parfois associé au carcinome canalaire. Ce carcinome est caractérisé par la présence de mucus extracellulaire, visible macroscopiquement, dans lequel flottent des cellules tumorales mucosecrétantes. C'est une tumeur de bon pronostique et peu fréquente (2 %).

Le carcinome tubulaire est un cancer invasif qui se présente sous la forme d'un petit cancer étoilé d'évolution lente. Il représente 1 à 2% des cancers du sein. Il est souvent multicentrique, bilatéral avec une histoire familiale de cancer du sein. Les métastases ganglionnaires axillaires sont rares et le pronostique est meilleur que celui du carcinome canalaire infiltrant.

3.1.4.3. Tumeurs malignes non-carcinomateuses

Les tumeurs non-carcinomateuses ne représentent que 2 % des cancers du sein. Nous citerons pour exemple les sarcomes primitifs, le lymphome non-Hodgkinien primitif (très rare), et les métastases (provenant de cancers primitifs tels les mélanomes, les cancers de l'ovaire, du tube digestif ou des bronches).

3.1.4.4. Les sarcomes primitifs

Ces lésions prennent naissance au niveau du tissu conjonctif extra-lobulaire. Des liposarcomes ou des fibrosarcomes peuvent survenir mais sont très rares. Des angiosarcomes ont également été décrits de manière exceptionnelle et font partie des cancers du sein les plus létaux.

3.1.4.5. Les lésions non-cancéreuses

La maladie ou l'état fibrokystique (MFK) se manifeste par la présence d'une nodosité (petite masse) associée à des douleurs ou à une sensibilité des seins. La MFK se déclare par un ou plusieurs kystes formés d'une poche remplie de liquide.

Le fibroadénome est une lésion bénigne courante du sein. Contrairement aux tumeurs cancéreuses, les fibroadénomes se développent à partir d'un lobule unique et non d'une cellule unique. Il en résulte une aberration du processus normal de

développement des lobules. Les fibroadénomes sont plus hormonosensibles que la plupart des tumeurs bénignes.

3.1.5. Facteurs de risque

Un facteur de risque est un élément de l'historique du patient qui peut expliquer l'apparition de la pathologie. Cependant, en aucun cas les facteurs de risque ne constituent les seules explications au développement du cancer. Il existe différents facteurs de risque dont les principaux sont le sexe, l'âge, les facteurs génétiques et reproductifs et les déséquilibres hormonaux. Ces facteurs sont principalement liés à la vie reproductive des femmes (Figure 14) (Dumitrescu *et al.*, 2005). Un accroissement du risque est corrélé à l'apparition précoce des règles, à la nulliparité, à une première naissance à un âge tardif, à une ménopause tardive, ainsi qu'à des facteurs hormonaux, qu'ils soient endogènes (taux plasmatique et tissulaire d'œstrogènes élevés) ou exogènes (par exemple, utilisation prolongée de contraceptifs oraux ou traitement hormonal de substitution).

Les autres facteurs de risque sont l'obésité et surtout l'alimentation caractérisée par un apport calorique élevé non contre-balancé par une activité physique suffisante, une consommation élevée de graisse animale totale et saturée ainsi qu'une alimentation pauvre en fruits et légumes et riche en viande et alcool. L'implication des xéno-œstrogènes et de certains pesticides reste à l'heure actuelle controversée. Les rayonnements ionisants, en particulier lors de la phase de développement de la glande mammaire chez l'adolescente, sont aussi un facteur de risque.

Par ailleurs, les femmes présentant des lésions épithéliales prolifératrices, en particulier avec une hyperplasie canalaire ou lobulaire atypique, ont quatre à cinq fois plus de risque de développer un cancer du sein (Harris *et al.*, 1997).

Enfin, les antécédents familiaux représentent certainement le risque le plus reconnu. En effet, le risque relatif d'apparition d'un cancer du sein est multiplié par deux ou trois pour une femme possédant une parente au premier degré (mère, sœurs, filles) ayant déjà eu un cancer du sein (Sakorafas *et al.*, 2000).

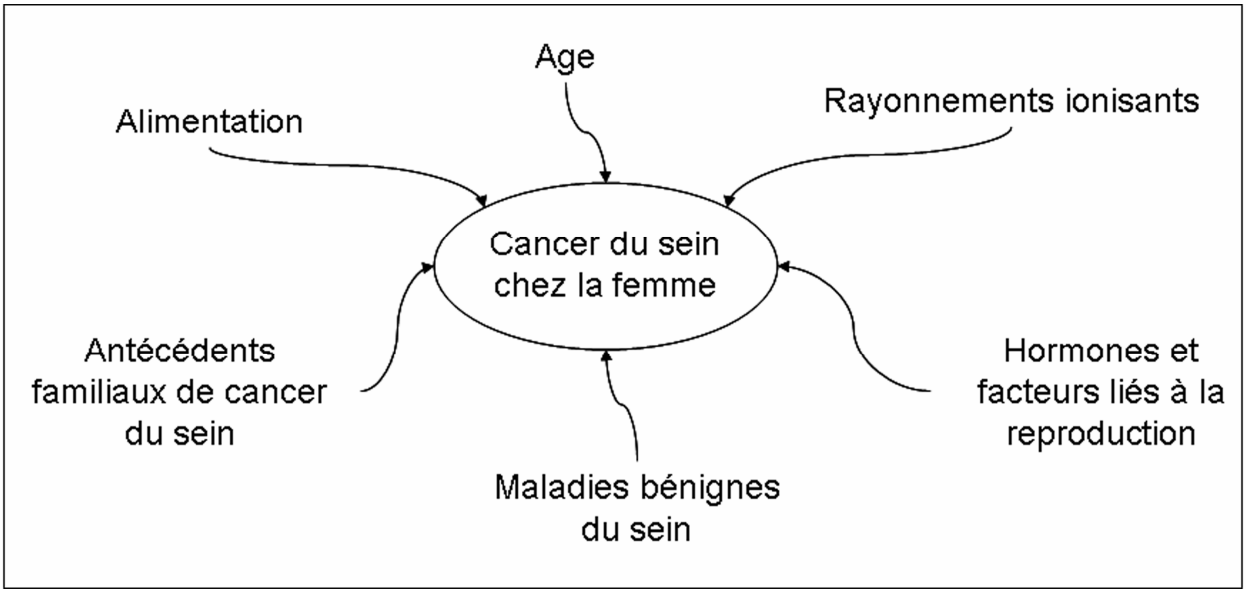


Figure 14 : Facteurs de risque de développement du cancer du sein.

3.1.6. Marqueurs pronostiques du cancer du sein

Les marqueurs pronostiques permettent d'identifier des sous-groupes de patientes dont les risques de rechutes locales ou à distance sont comparables et de leur proposer un traitement adapté. L'enjeu est alors de ne pas « sur-traiter » les patientes à évolution favorable et de réserver des thérapies plus agressives à des patientes à haut risque d'évolution rapide.

Il y a à ce jour plus de 100 facteurs identifiés comme ayant une valeur pronostique dans le cas du carcinome de sein. Cependant, seulement une minorité a été étudiée par des analyses multivariées. Les facteurs pronostiques les plus importants sont :

- la présence et nombre de ganglions envahis (paramètres prépondérants),
- l'âge de la patiente,
- la taille de la tumeur,
- le grade SBR,
- l'invasion lymphatique et vasculaire.

D'autres paramètres telle que l'expression des récepteurs hormonaux, de ERBB2/Neu, ou de p53 ont une valeur plus prédictive que pronostique.

3.1.7. Cytogénétique

Beaucoup d'aberrations chromosomiques observées dans les carcinomes mammaires ne sont pas spécifiques de ce type de cancer. L'étude des caryotypes des tumeurs du sein a montré l'existence d'un haut degré d'hétérogénéité intratumorale.

Des altérations des chromosomes 1q, 3p, 6q, 8p sont souvent présentes et des amplifications d'ADN associées au chromosome 8p sont observées couramment dans les carcinomes du sein. La perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity, (LOH)) consiste en des délétions physiques de fragments génomiques importants pouvant contenir de gènes suppresseurs de tumeur. Les régions communément sujettes aux LOH dans les cancers du sein sont localisées sur les chromosomes : 1p, 1q, 3p, 6q, 8p, 11q, 13q, 16q, 17p, 17q. La plupart des tumeurs mammaires

présentent des LOH dans une ou plusieurs régions et certaines régions sont perdues dans plus de 50 % des tumeurs telles les régions 8p, 16q, 17p.

Des données obtenues par hybridation génomique comparative (Comparative genomic hybridization (CGH)) ont montré que les génomes des tumeurs de sein subissaient des réarrangements importants. Moins de 10% des tumeurs analysées par cette technique apparaissaient avoir un génome normal. Enfin, il apparaît que le nombre d'événements (perte ou gain) augmente dans les cancers les plus avancés.

3.2. Traitements standards des cancers du sein

Les traitements standards actuels débutent par une chirurgie d'exérèse – le plus souvent conservatrice – suivie d'une radiothérapie loco-régionale et dans certain cas d'un traitement systémique adjuvant à base de chimiothérapie et/ou d'hormonothérapie. Il existe une prise en charge spécialisée selon le type et le grade de la tumeur. Egalement, l'état général de la patiente est pris en compte dans l'établissement du protocole thérapeutique.

3.2.1. Chirurgie

Le but de la chirurgie, qui consiste en une exérèse large de la tumeur et un curage ganglionnaire axillaire, est de recueillir des éléments de pronostique et de participer au traitement loco-régional. Il existe différentes interventions chirurgicales possibles en fonction de la lésion cancéreuse, de la taille de la tumeur et de sa localisation. Dans tous les cas, il y a nécessité d'une analyse anatomo-pathologique et/ou radiologique.

3.2.2. Radiothérapie

Le but de la radiothérapie est de diminuer les récidives locales du cancer du sein et de permettre la conservation du sein dans certaines conditions. Actuellement, la radiothérapie fait partie du traitement loco-régional du cancer du sein et est également utilisée en phase métastatique comme traitement palliatif, surtout dans les localisations osseuses et cérébrales (Pierce *et al.*, 2005).

L'effet biologique des radiations ionisantes s'explique par la production de radicaux libres instables et chimiquement très réactifs qui induisent des coupures double brin d'ADN ou des sites abasiques. Ces évènements, en l'absence de réparations, induisent l'apoptose.

Les complications de la radiothérapie sont rares. Des érythèmes ou des œdèmes du sein sont parfois notés. Des altérations des fonctions pulmonaire et cardiaque sont rares, et le risque de cancer radio-induit est en cours d'évaluation.

3.2.3. Les traitements médicamenteux

Les traitements médicamenteux peuvent être à visée curative, comme les traitements adjuvants (administrés après la chirurgie) ou néo-adjuvants (avant la chirurgie) ou bien à visée palliative, notamment dans le cadre d'un cancer métastatique (Shannon *et al.*, 2003).

3.2.3.1. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie a pour but également d'améliorer le contrôle loco-régional de la maladie mais également de réduire les risques de cancer contro-latéral. L'hormonothérapie est administrée chez les patientes ayant un cancer du sein

hormono-dépendant dans le but de bloquer l'activité mitogénique des œstrogènes sur le tissu tumoral.

La présence des récepteurs aux hormones œstrogènes et progestérones est utilisée pour guider le choix de l'hormonothérapie.

3.2.3.2. La chimiothérapie

Les agents chimiothérapeutiques cytotoxiques exerce leur action sur le cycle cellulaire en inhibant les mitoses, conduisant ainsi à la mort cellulaire. La chimiothérapie est d'autant plus efficace que les cellules ont une haute fréquence de réplication. Elle est donc surtout active sur les tumeurs à croissance rapide. La chimiothérapie est également toxique sur les tissus sains à renouvellement élevé (la moelle osseuse ou le tube digestif). Ces agents cytotoxiques agissent à différents stades de la multiplication cellulaire : création de ponts disulfure entre les brins d'ADN, inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la réplication et de la transcription d'ADN, action sur le fuseau microtubulaire, inhibition de la synthèse protéique... Différentes combinaisons sont actuellement administrées, associant le plus souvent plusieurs médicaments à mécanismes d'action différents dont les plus efficaces et les plus utilisés sont représentés dans le tableau 7 (Hamilton *et al.*, 2005). Dans le cas du cancer du sein, la chimiothérapie est indiquée dans le cas de cancer du sein à un stade avancé avec envahissement ganglionnaire et/ou métastases. Les traitements adjuvants (ou néoadjuvants) consistent en l'administration d'agents cytotoxique immédiatement après (ou avant) le traitement chirurgical. Plusieurs études cliniques rapportent les avantages et inconvénients de tels traitements utilisant des agents anti-microtubules (Altundag *et al.*, 2006, Estevez *et al.*, 2004, Goble *et al.*, 2003, Nowak *et al.*, 2004). Il a été rapporté qu'un traitement

chimiothérapeutique adjuvant associant docetaxel (agent anti-microtubules) + doxorubicin (agent intercalant de l'ADN) + cyclophosphamide (agent alkylant) augmentait significativement, par rapport à un traitement adjuvant associant fluorouracil (anti-métabolite) + doxorubicine + cyclophosphamide, la survie générale et la survie sans rechute de patientes atteintes d'un cancer du sein opérable avec envahissement ganglionnaire (Martin *et al.*, 2005).

Tableau 7 : Principales molécules utilisées en chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein (Hamilton *et al.*, 2005).

Mode d'action	Classe chimique	Molécules
Agents intercalants de l'ADN	Anthracyclines Anthracènes diones	Adriamycine, Epirubicine, Pirarubicine Mitoxantrone
Anti-métabolites	Antifoliques Antipyrimidiques	Méthotrexate 5-fluorouracile, Gemcitabine, Capécitabine
Alkylants	Oxaphosphorines Dérivés du platine	Cyclophosphamide, Mitomycine C Cisplatine
Anti-microtubulaires	Taxanes	Paclitaxel
	Vinca alkaloides	Vincristine

PARTIE II :
RESULTATS ORIGINAUX

4. MATERIELS ET METHODES

4.1. Modéles cellulaires

Au cours nos travaux de recherche, nous avons utilisé différentes lignées cellulaires de cancer du sein commercialisées et dont la plupart des caractéristiques sont connues.

4.1.1. Modèle de cellules immortalisées : hTert-HME-1 (HME-1)

Cette lignée (N° ATCC (American Type Culture Collection) CRL-4010) est dérivée de cellules d'épithélium mammaire normal provenant d'une patiente âgée de 53 ans ayant subi une chirurgie mammaire réductrice et sans antécédent de cancer du sein. Ces cellules ont ensuite été immortalisées par infection du vecteur rétroviral pBabepuro contenant la séquence codante du gène *hTerT* et sélectionnées en présence de puromycine. Ces cellules ne subissent pas d'arrêt de croissance au cours de la culture grâce à l'expression du gène de la télomérase.

4.1.1.1. Analyse cytogénétique

Cette lignée est diploïde avec un mode du nombre de chromosomes égal à 46 et un faible taux de polyploïdie.

4.1.1.2. Morphologie

Les cellules sont adhérentes et présentent des formes allongées de type fusiforme, avec des prolongements cytoplasmiques plus ou moins grands selon l'état

de la confluence cellulaire (Figure 15). On distingue une polarisation cellulaire avec la présence de lamellipodes.

4.1.1.3. Composition du milieu de culture

Les cellules HME-1 et leur dérivés ont été cultivées dans un mélange contenant du milieu DMEM (40%), du milieu Ham's F12 (40%), de l'Hepès (10mM), des acides aminés non essentiels (NEAA) (1%), de la L-glutamine (2mM), de la gentamycine (50µg/ml), de l'insuline actapid® (3.5µg/ml), de l'EGF (100ng/ml), de l'hydroxycortisone (500ng/ml), de la pénicilline (200UI/ml), de la streptomycine (200 µg/ml) et du sérum de veau fœtal (10%) à 37°c dans une atmosphère contenant 5% de CO_2.

4.1.2. Modèles de cellules cancéreuses : MCF7 et MDA-MB-231

Les lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB-231 font partie des cellules les plus utilisées par les laboratoires travaillant dans le domaine de la cancérologie.

4.1.2.1. MCF7

Les cellules MCF7 (N° ATCC HTB-22) sont des cellules épithéliales isolées d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire chez une patiente âgée de 69 ans, de type caucasien. Cette lignée a gardé plusieurs caractéristiques des cellules différenciées telles que la capacité de réponse aux traitements par l'œstradiol par ces récepteurs aux œstrogènes et la capacité à former des colonies de cellules en condition de croissance tridimensionnelle.

4.1.2.1.1. Analyse cytogénétique

Ces cellules sont fortement aneuploïdes avec un mode du nombre de chromosomes égal à 82 et une variation allant de 66 à 87 chromosomes (de l'hypertriploïdie à l'hypotetraploïdie). Le chromosome 20 est absent.

4.1.2.1.2. Morphologie

Ces cellules sont adhérentes et ont une forme pseudo-circulaire avec de rares prolongements cytoplasmiques et aucune polarisation cellulaire. Elles se présentent souvent sous forme de petits amas cellulaires avec peu de cellules individualisées (figure 15).

4.1.2.1.3. Composition du milieu de culture

Les cellules MCF7 et leur dérivés ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant de la pénicilline (200UI/ml), de la streptomycine (200 µg/ml) et du sérum de veau fœtal (10%) à 37°c dans une atmosphère contenant 5% de CO_2.

4.1.2.2. MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 (N° ATCC HTB-26) sont des cellules épithéliales isolées d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire chez une patiente âgée de 51 ans, de type caucasien.

4.1.2.2.1. Analyse cytogénétique

Cette lignée cellulaire est aneuploïde avec un nombre de chromosomes correspondant à une pseudo-triploïdie (nombre modal de chromosomes = 64, variation = de 52 à 68). Les chromosomes 8 et 15 sont absents. Il y a présence de

chromosomes non identifiés et la plupart des chromosomes autosomaux sont trisomiques.

4.1.2.2.2. Morphologie

Les cellules sont adhérentes et sont de type fusiforme, sans lamellipode (pas de polarisation), avec des prolongements cytoplasmiques plus ou moins grands selon la confluence cellulaire (figure 15).

4.1.2.2.3. Composition du milieu de culture

Les cellules MDA-MB-231 et leur dérivés ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant de la pénicilline (200UI/ml), de la streptomycine (200 µg/ml) et du sérum de veau fœtal (10%) à 37°c dans une atmosphère contenant 5% de CO_2.

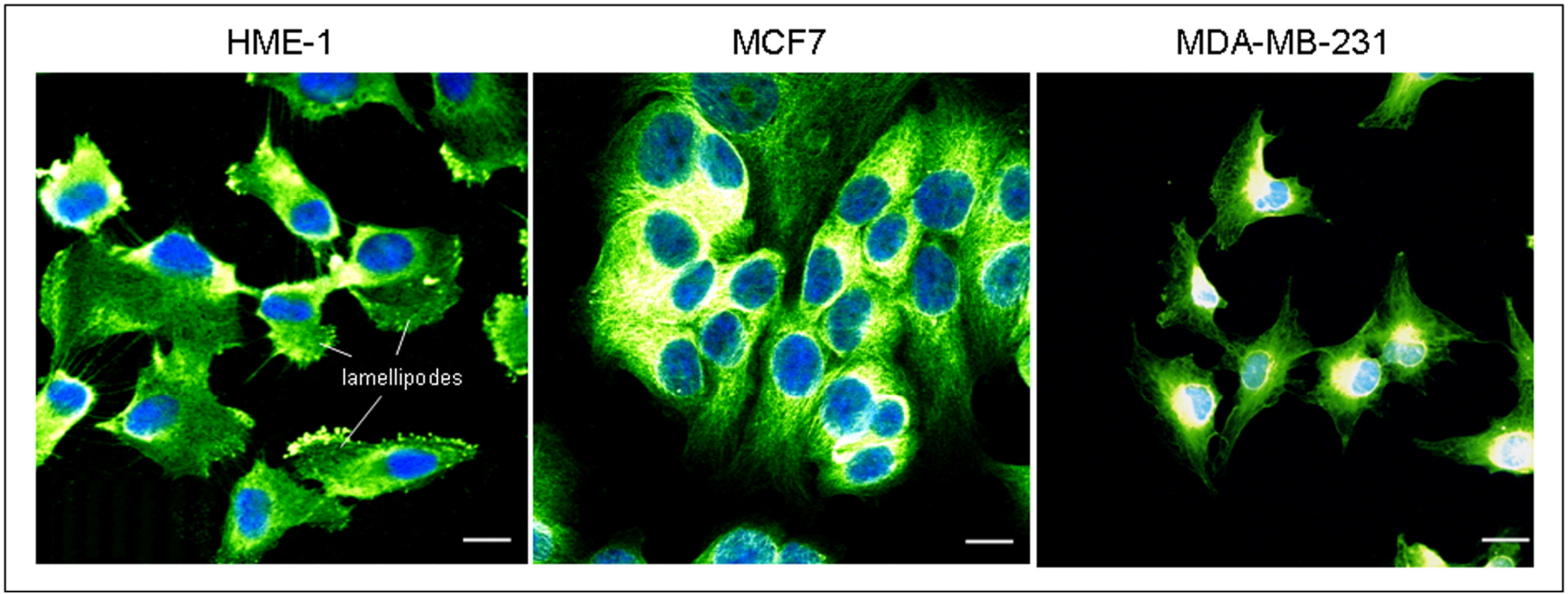


Figure 15 : Cellules HME-1, MCF7 et MDA-MB-231 après marquage avec un anticorps anti-β-tubuline (vert) et avec un marqueur nucléaire (DAPI, bleu). La barre d'échelle représente 10 µm.

Noms	Types cellulaires	Cytogénétique	Composition du milieu culture
HME-1	Cellules d'épithélium mammaire normal immortalisées par hTert	diploïdes	-DMEM (40%), -Ham's F12 (40%), -Hepès (10mM), -acides aminés non essentiels (NEAA) (1%), -L-glutamine (2mM), -gentamycine (50µg/ml), -insuline actapid® (3.5µg/ml), -EGF (100ng/ml), -hydroxycortisone (500ng/ml), -pénicilline (200UI/ml), -streptomycine (200 µg/ml), -sérum de veau fœtal (10%)
MCF7	Cellules épithéliales isolées d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire	hypertriploïdes à hypotetraploïdes (mode=82), chromosome 20 absent	-DMEM (90%) -pénicilline (200UI/ml), -streptomycine (200 µg/ml) -sérum de veau fœtal (10%)
MDA-MB-231	Cellules épithéliales isolées d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire	pseudo-triploïdes (mode= 64), chromosomes 8 et 15 absents	-DMEM (90%) -pénicilline (200UI/ml), -streptomycine (200 µg/ml) -sérum de veau fœtal (10%)

Tableau 8 : Principales caractéristiques des modèles cellulaires utilisés.

4.2. Techniques de transfection cellulaire

4.2.1. Construction des plasmides et transfections stables

Un insert correspondant au gène complet d'*Arl2* a été cloné à partir de l'ADNc issu des cellules HME-1 dans le vecteur plasmidique pcDNA3 comportant le gène de résistance à la généticine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) pour obtenir des constructions sens et antisens. Les cellules MCF7 ont été transfectées de façon stable avec le vecteur vide pcDNA3 (cellules nommées MCF7/pcDNA3 (MP)) ou avec le plasmide pcDNA3 contenant le gène *Arl2* en sens (cellules MCF7/Arl2+ (MA+)) ou en antisens (cellules MCF7/Arl2- (MA-)) en utilisant l'agent de tranfection Lipofectine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules MDA-MB231 et les cellules HME-1 ont été transfectées de la même façon pour obtenir respectivement les cellules MDA/Arl2+ et HME-1/Arl2+ (MDAA+, HA+) ; les cellules MDA/pcDNA3 et HME-1/pcDNA3 (MDAP, HP) ; et les cellules MDA/Arl2- et HME-1/Arl2- (MDAA-, HA-). Les cellules transfectées ont été sélectionnées en utilisant la généticine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Les cellules MDAA-, MDAP et MDAA+ ont ensuite été cotransfectées de la même façon que précédemment avec le plasmide exprimant le gène de la luciférase *firefly* (pGL3-basic, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et avec un plasmide exprimant un gène de résistance à la puromycine (pSuper/Puro; Oligoengine). Les cellules transfectées ont été sélectionnées en utilisant la puromycine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et leur bioluminescence mesurée *in vitro* par incubation de Luciferine-EF® (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et par lecture au luminomètre (Lumiskan-Ascent, Labsystems, Issy-les-Moulineaux, France). Les 3

lignées bioluminescentes obtenues ont été nommées MDAA-luc, MDAPluc et MDAA+luc et utilisées pour des études *in vivo.*

4.2.2. Inhibition de l'expression génique par short interference ARN (siARN)

Une séquence de siARN a été déterminée en utilisant l'algorithme du site de Qiagen (Valencia, CA). En utilisant les bases de données du NCBI et le logiciel BLAST, aucune autre correspondance que le gène *Arl2* n'a été identifiée pour cette séquence, prouvant la spécificité de la séquence utilisée. Un siARN témoin (siRNA scrambled) ne ciblant aucun gène (Dharmacon, Chicago, USA) a été utilisé comme contrôle. Ces séquences de siARN ont été transfectées selon le protocole du fournisseur dans les cellules MCF7 en utilisant l'agent de transfection Oligofectine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La concentration finale transfectée de siARN était de 200nM.

4.3. Techniques de biologie moléculaire

4.3.1. Séquençage du gène d'Arl2

Le gène d'*Arl2* a été séquencé à l'Unité d'Oncologie Moléculaire (Dr. Qing Wang) du Centre Léon Bérard (Lyon). Les 21 lignées utilisées pour ce séquençage étaient des lignées issues d'adénocarcinome mammaire ou des cellules immortalisées d'épithélium mammaire : SKBR3, T47D, MDA-MB-549, MDA-MB-459, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-316, BT474,

BT20, HCC1937, HME-1, LAT-CLB, MCF12A, MCF7, HS578T, CAL51, HBL100, ZR751, ZAN-CLB.

4.3.2. RT-PCR quantitative en temps réel

L'extraction des ARN totaux, la réaction de reverse-transcription et la PCR quantitative en temps réel ont été effectuées comme décrites précédemment en utilisant un thermocycler Lightcycler (Roche, Manheim, Germany) (Galmarini *et al.*, 2002, Jordheim *et al.*, 2004). La quantité d'ADNc a été standardisée en utilisant des amorces et une sonde pour le gène de l'ARN ribosomal 18S (Applied Biosystems, Foster City, Canada). Le programme utilisé pour les gènes d'intérêts Arl2, PP2Ac, et TBC-D était 50 cycles de 15 sec de dénaturation à 95°c, suivi de 5 sec d'hybridation à 58°c et suivi de 10 sec d'extension à 72°c. Le programme utilisé pour les gènes d'intérêts p21/Waf1, PIG3, PUMA alpha/beta consistait en 50 cycles de 15 sec de dénaturation à 95°c, suivi de 30 sec d'hybridation à 59°c et suivi de 10 sec d'extension à 72°c. Les séquences des amorces spécifiques pour le gène Arl2 étaient 5'-GGCTCCTGACCATTCTGAAG et 3'-TGTAGTTCTGGGACCTCGTG ; pour PP2Ac : 5'-CCCTGGATCGTTTACAGGAA et 3'-ATGGTAAAAGTCACGTGGGT ; pour TBC-D : 5'-TGTCAAGCAAAGCAAGATGT et 3'-GATACGACGGTGACAGGAG ; pour p21/Waf1 : 5'-TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC et 3'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA, pour PIG3 : 5'-CAACGCTGAAATTCACCAAA et 3'-GGATCCGCCTATGCAGTCTA et pour PUMA alpha/beta: 5'-GACCTCAACGCACAGTACGA et 3'-AGGACCCTCCAGGGTGAG. Les résultats obtenus ont été analysés grâce au logiciel Relquant (Roche, Manheim, Germany) et exprimés en unité arbitraire en utilisant la lignée cellulaire MP comme référence.

4.3.3. Extraction des protéines et Western-Blot

L'expression totale des protéines a été déterminée par analyse Western Blot. Les protéines totales ont été extraites des différentes lignées cellulaires avec un tampon de lyse composé de Tris-HCL pH 6,8 20 mM, MgCl2 1mM, EGTA 2 mM, NP40 0,5% et inhibiteurs de protéases 0,1-30 mg/ml. Dans le cas de la protéine Arl2, le tampon de lyse spécifique utilisé était composé d'Imidazole-HCL pH 7,0 20mM, d'EDTA 2mM, d'EGTA 2mM, et d'inhibiteurs de protéases 0,1-30 mg/ml et les cellules ont été soniquées dans ce tampon pendant 10 sec. La concentration protéique totale a été déterminée par la méthode de Bradford. Des quantités équivalentes de protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12% d'acrylamide), et transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham biosciences AB, Sweden). Les membranes ont été incubées avec différents anticorps primaires. L'anti α-tubuline (clone DM1A), l'anti pan-β-tubuline (clone Tub 2.1) et l'anti β-actine (clone AC-15) ont été achetés chez Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'anticorps primaire dirigé contre la sous-unité catalytique de PP2A (PP2Ac) (clone 1D6) a été acheté chez Upstate (Lake Placid, USA). L'anticorps primaire anti-p53 (clone DO7) a été acheté chez Dako (Glostrup, Denmark) et les anticorps anti phospho-sérine de p53 (phospho-ser6, phospho-ser9, phospho-ser15 (monoclonal: 16G8 clone), phospho-ser20, phospho-ser37, and phospho-ser392) ont acheté chez Cell Signaling Technology (Boston, USA).

Les anticorps polyclonaux dirigés contre Arl2 et contre TBC-D ont été respectivement et gracieusement fournis par R. Kahn (Emory University School of Medicine, Atlanta, USA) et par N. Cowan (New York University Medical Center, USA). Les protéines des cellules MP ont été utilisées comme référence (valeur

équivalente à 100%). Les valeurs de la β-actine ou de la β-tubuline sont utilisées comme témoin de la standardisation.

4.3.4. Evaluation de l'activité phosphatase de PP2A

L'activité spécifique de phosphatase de PP2A a été étudiée en utilisant un système basé sur l'immunoprécipitation de PP2Ac (Upstate-Millipore, USA) en suivant les recommandations du fournisseur et en utilisant 300 µg de protéines totales pour chaque lignée cellulaire. Le peptide phosphorylé au niveau d'un résidu thréonine utilisé dans ce système était K-R-pT-I-R-R. La densité optique des produits suivant la réaction de déphosphorylation a été déterminée en utilisant un lecteur de plaque pour évaluer l'absorbance à 620 nm. Les échantillons ont été comparés à une courbe standard allant de 0 à 2000 pmol de phosphates libres. Les valeurs obtenues pour les cellules MP ont servis de référence.

4.4. Techniques d'étude des fractions de tubulines et de la dynamique des microtubules

4.4.1. Séparation et quantification des fractions d'hétérodimères d'αβ-tubuline solubles polymérisables, non polymérisables et microtubulaires.

La méthode utilisée est dérivée d'études précédentes utilisant un tampon spécifique permettant la polymérisation de la tubuline (Newton *et al.*, 2002, Sillje *et al.*, 2006). 20.10^6 cellules ont été collectées, immédiatement resuspendues dans 100 µl de tampon lyse composé de 100 mM Pipes, pH 6.7, de 1 mM EGTA, et de 1 mM

MgSO4 (tampon de lyse « tubulines ») et lysées par un cycle de choc thermique (congélation/décongélation). Les cellules lysées ont été ultracentrifugées (100,000 g, 1 heure, 20°C). Les surnageants contenaient les protéines (dont la tubuline) « solubles » alors que les culots contenaient la fraction « microtubule » des tubulines. 500µg de protéines des surnageants ont été incubées à 35°c pendant 30 min avec le même tampon de lyse « tubulines » supplémenté de 1mM de GTP pour permettre la polymérisation des tubulines et ont ensuite été ultracentrifugées (50 000 g, 45 min, 35 °C). Les culots obtenus contenaient les hétérodimères polymérisables de tubulines (PT) et les surnageants les tubulines non polymérisables (NPT). Les culots obtenus lors de la première ultracentrifugation et contenant les microtubules et d'autres protéines liées ou non aux microtubules ont été resuspendus dans 200µl de tampon de lyse « tubulines » et incubés à 4°c pendant 45 min pour permettre la dépolymérisation des microtubules et ensuite ultracentrifugés (50 000 g, 45 min, 4 °C). 500µg de protéines des surnageants obtenus ont alors subies un cycle de polymérisation en présence de 1mM de GTP, ultracentrifugées (50 000 g, 45 min, 35 °C) et les culots obtenus contenaient les protéines microtubulaires purifiées (MT) (voir figure 18). Une coloration à l'argent a été effectuée après migration des différentes fractions (PT, NPT et MT) sur gel de polyacrylamide-SDS (12% d'acrylamide) en respectant les instructions du fournisseur (Amersham biosciences AB, Sweden).

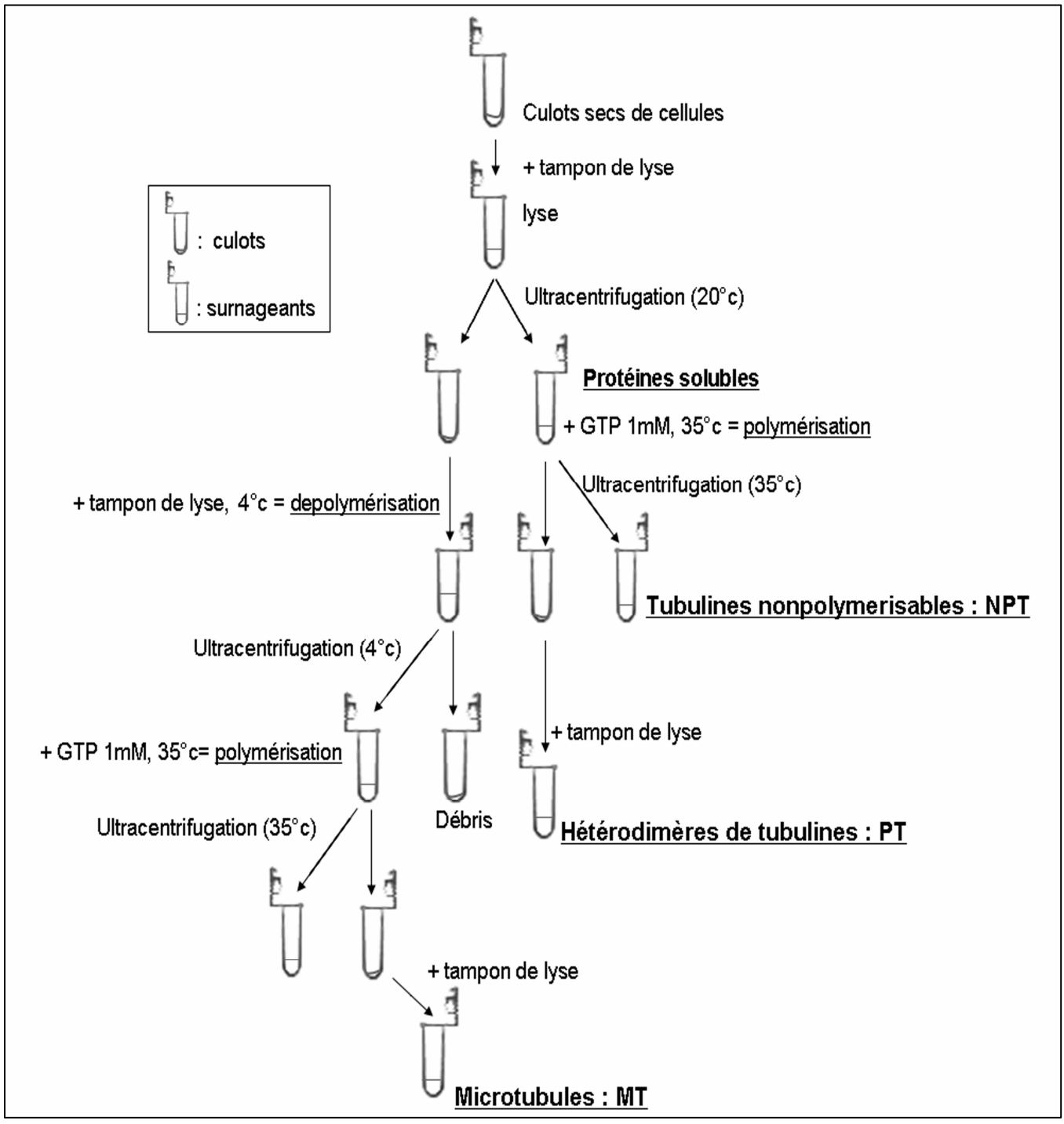


Figure 16 : Schéma de purification des fractions de tubulines.

4.4.2. Microinjection de tubuline-rhodamine et observation en temps réel des microtubules des cellules microinjectées

La microinjection de tubulines marquées, l'acquisition des images et la mesure de la dynamique microtubulaire ont été effectuées comme précédemment décrits (Pasquier *et al.*, 2005) au laboratoire CNRS-FRE 2737 dirigé par le Pr. D. Braguer, Université de la Méditerranée, UFR Pharmacie, 13005 Marseille (France).

Les cellules ont été ensemencées à faible densité cellulaire un jour avant la microinjection sur des lamelles de verres. Les injections ont été effectuées sous microscope inversé Leica DM-IRB en utilisant un objectif X40, un Femtojet et un micromanipulateur 5171 (Eppendorf, Hamburg, Germany). 4 heures après l'injection, les cellules microinjectées ont été placées en milieu RPMI sans bicarbonate de sodium, complété avec 25mM HEPES, 4.5 g/l glucose, et 60 µl d'Oxyrase (Oxyrase Inc., Mansfield, USA) dans une chambre à double lamelles maintenue à 37°c et observées sous un microscope à fluorescence (Leica DM-IRBE, objectif x 100). Trente à 41 images par cellules ont été prises à un intervalle de 4 secondes en utilisant une caméra Coolsnap-FX digital camera (Princeton instruments) et le logiciel Metamorph software (Universal Imaging, PA, USA).

4.4.3. Analyse de la dynamique des microtubules

Les positions des extrémités plus des microtubules situées en périphérie cellulaire ont été suivies et analysées en utilisant les logiciel ImageJ® et Microsoft Excel®. Les résultats sont représentés comme des courbes de suivies en temps réel (life-histroy plots). Une différence inférieure à 0,5 µm entre 2 mesures consécutives a été considérée comme une phase d'atténuation. Les fréquences de catastrophes

ont été calculées en divisant le nombre de transitions d'une phase de croissance ou de pause en une phase de raccourcissement par la somme des durées de phase de croissance. Les fréquences de sauvetages ont été calculées en divisant le nombre de transitions d'une phase de décroissance ou de pause en une phase de croissance par la somme des durées de phase de décroissance. La dynamicité représente l'échange des tubulines au niveau des extrémités plus des microtubules et est calculée en divisant la somme des distances parcourues en phase de croissance et raccourcissement par la durée totale d'observation du microtubule.

4.5. Techniques de biologie cellulaire

4.5.1. Détermination de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été estimée par le test utilisant le bromure de methylthiazoletetrazolium (MTT). 20.10^3 cellules ont été ensemencées par puits d'une plaque 24 puits et incubées à 37°c. Le MTT (500µg/puits) a été rajouté dans 3 puits toutes les 24 heures. Après 2 heures d'incubation à 37°c, les cristaux de formazan sont solubilisés et leur absorbance mesurée comme décrit précédemment (Jordheim *et al.*, 2004). Cette expérience a été effectuée jusqu'à 96 heures pour la prolifération des cellules en phase exponentielle de croissance et, dans le cas de l'évaluation de la prolifération de cellules confluentes, l'expérience a été menée jusqu'à 6 jours. Avant solubilisation des cristaux, les plaques ont été scannées afin d'obtenir les images montrant la répartition des cellules adhérentes.

4.5.2. Analyse de la distribution du cycle cellulaire par cytométrie de flux

Les cellules ont été collectées et incubées à 4°c pendant 2 heures avec 1ml d'une solution d'iodure de propidium à 0.05 mg/ml contenant 0.05% de Nonidet-P40. Les cellules marquées ont été analysées au cytomètre de flux FACS Calibur (BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgium) à l'aide du logiciel Modfit LT 2.0™ (VeritySoftware Inc, Topsham, United States). Les cellules ont été incubées pendant 48 heures avec une échelle de concentration de 1 à 100nM de taxol (Bristol-Myers Squibb, New York, USA) ou de vinorelbine (Pierre Fabre medicaments, Boulogne, France) pour l'étude de l'arrêt en G2/M ; ou pendant 72 heures avec la même échelle de concentration de taxol ou de vinorelbine ou avec une échelle de concentration de 0.1 à 10µM de gemcitabine (Gemzar®; Lilly, USA) pour la détection de la phase sub G0-G1.

4.5.3. Tri cellulaire selon la quantité d'ADN par cytométrie de flux

Les cellules HA- ont été incubées à 37°c pendant 1heure avec 10 µg/ml d'Hoescht 33342 (marquage non toxique de l'ADN, Roche, Manheim, Germany). Les cellules ont été rincées, collectées et immédiatement triées au cytomètre de flux au Centre Commun de Quantimétrie (Lyon, Université Claude Bernard, France) selon leur contenu en ADN (2N et 8N). Les cellules ont ensuite été remises en condition de culture normale.

4.5.4. Immunofluorescence et détermination des indices mitotiques, ana-telophasiques et cytokinétiques par microscopie confocale

Les cellules ont été exposées à 10 nM de taxol ou de vinorelbine ou à 1 µM de gemcitabine pendant 72 heures. Les cellules exposées ou non ont ensuite été fixées avec une solution de paraformaldehyde 4% pendant 15 min et perméabilisées avec une solution de PBS-Triton X-100 0.1% pendant 15 min à température ambiante. Les sites non-spécifiques ont été bloqués par une solution de PBS contenant 3% d'albumine bovine, et 1% de sérum de veau fœtal. Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires monoclonaux anti α-tubuline (clone DM1A, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), ou anti PP2Ac (clone 1D6, Lake Placid, USA), ou anti phospho-ser15-p53 (clone 16G8, Cell Signaling Technology, Boston, USA), ou anti p53 (clone DO7, Dako, Glostrup, Denmark), ou anti-p21 (Oncogene Science, USA), ou anti β-actine (clone AC-15, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) suivis des anticorps secondaires couplés au fluorochrome FITC (Dako, Glostrup, Denmark) ou au PE (Dako, Glostrup, Denmark). Le marquage de l'ADN a été réalisé par incubation avec le di-aminido-phenyl-indol (DAPI) (Roche, Manheim, Germany).

Les images ont été prises par un microscope confocal fluorescent TCS Sp2 DMRXA (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France, objectif x40) au Centre Commun de Quantimétrie (Lyon, Université Claude Bernard, France). Un minimum de 600 cellules ont été observées pour chaque lignée cellulaire. Les indices mitotiques, ana-telophasiques ont été déterminés par marquage de l'ADN au DAPI. L'indice cytokinétique a été mesuré en utilisant le marquage α-tubuline (marquage

des corps intermédiaires). La couleur jaune correspond à un signal élevé et la couleur vert foncé à un signal faible. Les pourcentages de noyaux positifs ont été calculés par rapport aux cellules non exposées. Le calcul de la circularité correspond à : Circularité = 4π(aire/périmètre2).

4.5.5. Quantification des cellules positives au marquage de l'Annexine V par microscopie (calcul de l'index apoptotique)

Après 72 heures d'exposition à 10nM de taxol ou vinorelbine ou à 1µM de gemcitabine, les cellules ont été fixées par incubation avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15 min et les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de PBS contenant 3% d'albumine bovine et 1% de sérum de veau fœtal. Le marquage de l'Annexine V a été effectué en suivant les recommandations du fabricant (Roche, Manheim, Germany). Le DAPI a été utilisé pour effectuer le marquage de l'ADN (Roche, Manheim, Germany) et évaluer le pourcentage de cellules vivantes adhérentes. Les images ont été obtenues en utilisant un microscope Leica DMR-RXA (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France, objectif x40) au Centre de Commun de Quantimétrie (Université Lyon 1, France). Au moins 300 cellules ont été comptabilisées par lignée cellulaire.

4.5.6. Etudes des durées des phases mitotiques par observation microscopique en temps réel des cellules

Les cellules ont été placées à la température constante de 35°c en milieu DMEM sans bicarbonate de sodium et contenant 35 mM HEPES, 4.5 g/l glucose, à pH ajusté à 7.3 et observées au microscope inversé Diavert (Leica Microsystems,

Rueil-Malmaison, France, objectif x6,3). Les images ont été acquises toutes les 5 minutes pendant 15 heures par une caméra Sanyo VC-2512 (SANYO Scientific, Bensenville, United States) pilotées par le logiciel Leica Q570 au Centre Commun de Quantimétrie (Lyon, Université Claude Bernard, France). Les 3 lignées cellulaires ont été observées dans la même plaque et un minimum de 10 mitoses ont été analysées par lignée cellulaire.

4.5.7. Etudes de cytotoxicité

Les études de cytotoxicité ont été effectuées comme décrit par Jordheim *et al.* (Jordheim *et al.*, 2005). Les cellules MP ont été ensemencées à raison de 1 000 cellules par puits de plaques de 96 puits et exposées, 24 heures après ensemencement, avec 10nM d'acide okadaïque pendant 2 heures (Biovision Inc., USA). Le milieu a ensuite été enlevé et remplacé par du milieu contenant différentes concentrations de taxol et de vinorelbine. Après 6 jours, le bromure de methylthiazoletetrazolium (MTT) a été rajouté et incubé pendant 2 heures à 37°c et les milieux ont été remplacés avec une solution d'isopropanol/H_2O/HCl solubilisant les cristaux de formazan. Leur absorbance a été mesurées comme décrit précédemment (Jordheim *et al.*, 2004). La concentration inhibitrice 50 (IC50) a été définie comme la concentration inhibant la prolifération cellulaire de 50% par rapport au niveau de prolifération des cellules non traitées.

4.5.8. Croissance cellulaire en agar-mou et en agar-mou/matrigel

20 000 cellules ont été suspendues dans 1,5 ml d'un mélange de milieu DMEM+0,45% d'agarose à point de fusion faible (ou low melting point (LMP)

agarose) (gel du haut) puis rajoutées au-dessus de 1,5 ml d'un mélange DMEM+0,75% d'agarose LMP solidifié au fond d'un puit de plaque 6 puits (gel du bas). Dans le cas du test agar-mou/matrigel, 30% (v/v) de matrigel (BDBiosciences, Erembodegem, Belgium) ont été rajoutés au gel du bas. Les colonies cellulaires ont été photographiées, comptées et mesurées 26 jours après l'ensemencement au Centre Commun de Quantimétrie (Lyon, Université Claude Bernard, France).

4.5.9. Culture cellulaire tridimensionnelle en matrigel

La culture en matrigel a été effectuée comme décrit précédemment (Debnath *et al.*, 2003). 100µl de matrigel ont été ajoutés par puits d'une lame à chambre de 8 puits (Labteck, Nalge Nunc International, Rochester, USA) et placé à 37°c pendant 20 min pour permettre la polymérisation du matrigel en gel fin. Une suspension cellulaire de 12 500 cellules/ml dans une solution de milieu DMEM contenant 4% (v/v) de matrigel a été préparée et 400µl de ce mélange ont été ensemencés sur le haut du gel fin solidifié de matrigel pur. La formation des colonies cellulaires a été suivie par observation microscopique et acquisition d'images jusqu'à 20 jours après ensemencement (Centre de Commun de Quantimétrie (Université Lyon 1, France)). 3 puits par lignée au moins ont été analysés.

4.5.10. Test d'infiltration du matrigel

Pour chaque lignée cellulaire dérivée des cellules MDA-MB-231, une solution à 1.10^6 cellules/µl suspendues dans du milieu DMEM a été préparée. 300µl de matrigel pur (BDBiosciences) a été ajouté par puits d'une lame à chambre de 8 puits (Labteck, Nalge Nunc International, Rochester, USA). Avant la polymérisation du matrigel, 1µl de la suspension cellulaire a été rajouté soigneusement au milieu du

gel épais de matrigel. Les gels de matrigel contenant les cellules ont été solidifées à 37°c pendant 2 heures et les cellules ainsi ensemencées ont formé une masse compacte de cellules. Les cultures ont été analysées par microscopie et analyse d'images au Centre de Commun de Quantimétrie (Université Lyon 1, France) jusqu'à 5 jours après ensemencement. L'aire de migration cellulaire à travers le matrigel a été quantifiée en utilisant le logiciel d'analyse d'images ImageJ. 5 puits au moins par lignée ont été analysés.

4.6. Techniques d'études *in vivo*

4.6.1. Test de tumorogénécité *in vivo* par xénogreffes

Pour chaque lignée cellulaire, 5 souris femelles scid (Charles River Laboratories Inc) âgées de 6 semaines ont reçu une injection de 2.10^6 cellules suspendues dans 50µl d'une solution à 50% (v/v) de PBS et de matrigel au niveau de la graisse mammaire abdominale. La taille des tumeurs a été mesurée 2 fois par semaine. Les souris ont été euthanasiées par asphyxie au CO_2 et dislocation cervicale lorsque la tumeur atteignait un diamètre moyen de 1,5 cm. Les animaux ont été traités au sein de l'animalerie agréée du Centre Léon Bérard (N° agrément A69118) en accord avec les recommandations de l'Union Européenne sur l'utilisation des animaux de laboratoires.

4.6.2. Imagerie bioluminescente *in vivo*

Les animaux ont été injectés par voie intrapéritonéale avec le substrat de la luciférase la D-luciférine diluée dans du PBS (150mg/kg) (Invitrogen, Cergy

Pontoise, France) et anesthésiés (1-3% isoflurane,Bristol-Myers Squibb,USA). Les souris ont été placées à l'intérieure d'une chambre noire sous une caméra à comptage de photon (NightOWL II LB 983, Berthold Technologies, Germany) avec maintien de l'anesthésie au masque par un mélange air/4% d'O_2/1-2% d'isoflurane. La quantification de la bioluminescence (photons/seconde) des tumeurs a été effectuée par le logiciel WinLight^{32} (Berthold Technologies, Germany) après soustraction du bruit de fond de chaque image.

4.6.3. Immunohistochimie des tumeurs produites par xénogreffes

Après fixation dans une solution de Bouin, les tumeurs prélevées sur des souris euthanasiées ont été hydratées par bain d'alcool, immergées dans une solution de xylène et incluses en paraffine. Les blocs de paraffine ont ensuite été coupés en section de 4µm. Les coupes ont été séchées à 58°c pendant 30 minutes. Après déparaffinisation et réhydratation, les sections ont été marquées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Cette technique a été effectuée au service d'anatomo-pathologie du Centre Léon Bérard (Dr. I Treilleux).

5. ETUDE DE L'INFLUENCE D'ARL2 SUR LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES DANS DES CELLULES DE CANCER DU SEIN

5.1. Introduction

L'étude de la dynamique des microtubules dans le cancer du sein constitue un domaine de haute importance tant en terme de développement tumoral qu'en terme de résistance aux agents chimiothérapeutiques et ce depuis que les taxanes, composés ciblant les microtubules, sont devenus un traitement standard pour les patientes atteintes de cette maladie.

Comme nous l'avons rappelé, différents travaux ont suggéré qu'Arl2 pouvaient avoir des implications dans la régulation du contenu cellulaire en hétérodimères d'αβ-tubulines. Arl2 interagit avec le cofacteur TBC-D et la phosphatase PP2A et est impliqué dans la régulation de leurs activités. Cependant, aucune étude n'a à ce jour démontré clairement l'implication de modifications d'expression d'Arl2 dans la régulation de la concentration en hétérodimères ainsi que dans celle de la dynamique microtubulaire. Nous avons alors émis l'hypothèse que des modifications du niveau d'Arl2 pourraient induire des modifications de concentration en hétérodimères polymérisables de tubulines résultant également en des perturbations de la dynamique microtubulaire. Afin de valider cette hypothèse, nous avons alors étudié les répercussions de modifications du contenu en protéine

Arl2 sur la concentration en tubulines solubles, la dynamique microtubulaire ainsi que sur la progression du cycle cellulaire.

5.2. Résultats

5.2.1. Séquençage du gène d'Arl2 dans plusieurs lignées cellulaires de sein

Nous avons effectué le séquençage du gène codant pour Arl2 dans 21 lignées de cancer du sein dont MCF7, MDA-MB231 et HME-1 (voir matériels et méthodes) à l'Unité d'Oncologie Moléculaire du Centre Léon Bérard (Lyon). Aucune mutation n'a été détectée dans ces lignées cellulaires, suggérant que des mutations de gène d'*Arl2* ne sont pas des événements fréquents. En revanche, des différences du niveau d'expression de la protéine Arl2 ont été observées entre certaines de ces lignées. De ce fait, nous avons établi des modèles de cellules dans lesquels nous avons uniquement modifié le niveau d'expression d'Arl2 sans induire de mutations au sein de sa séquence.

5.2.2. Niveau d'expression d'Arl2 dans les différentes lignées utilisées

Nous avons développé et caractérisé des transfectants stables des cellules MCF7 ayant une augmentation (cellules MCF7/Arl2+ (MA+)) ou une diminution (cellules MCF7/Arl2- (MA-)) du contenu en protéine en Arl2. Les cellules MCF7 transfectées avec le vecteur pcDNA3 vide (cellules MCF7/pcDNA3 (MP)) ont été utilisées comme lignée cellulaire de référence. Des variants stables d'une autre lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire MDA-MB-231 ont été également développés dans le but de confirmer les résultats obtenus. Le contenu en protéine

Arl2 est significativement diminué (-30%, $p<0.01$) dans les cellules MA- et augmenté (+20%, $p<0.01$) dans les cellules MA+ par rapport aux cellules MP (figure 17a). Des résultats similaires ont été observés dans les lignées dérivées des cellules MDA-MB-231 (données non représentées). Nous avons également effectué des transfections transitoires des cellules MCF7 en utilisant une séquence de siARN ciblant Arl2. 24 et 48 heures après transfection, le contenu en protéine Arl2 est significativement diminué ($p<0.05$, -30 à -60%) dans ces cellules par rapport aux cellules transfectées avec un siARN témoin (scrambled siARN) (figure 17b).

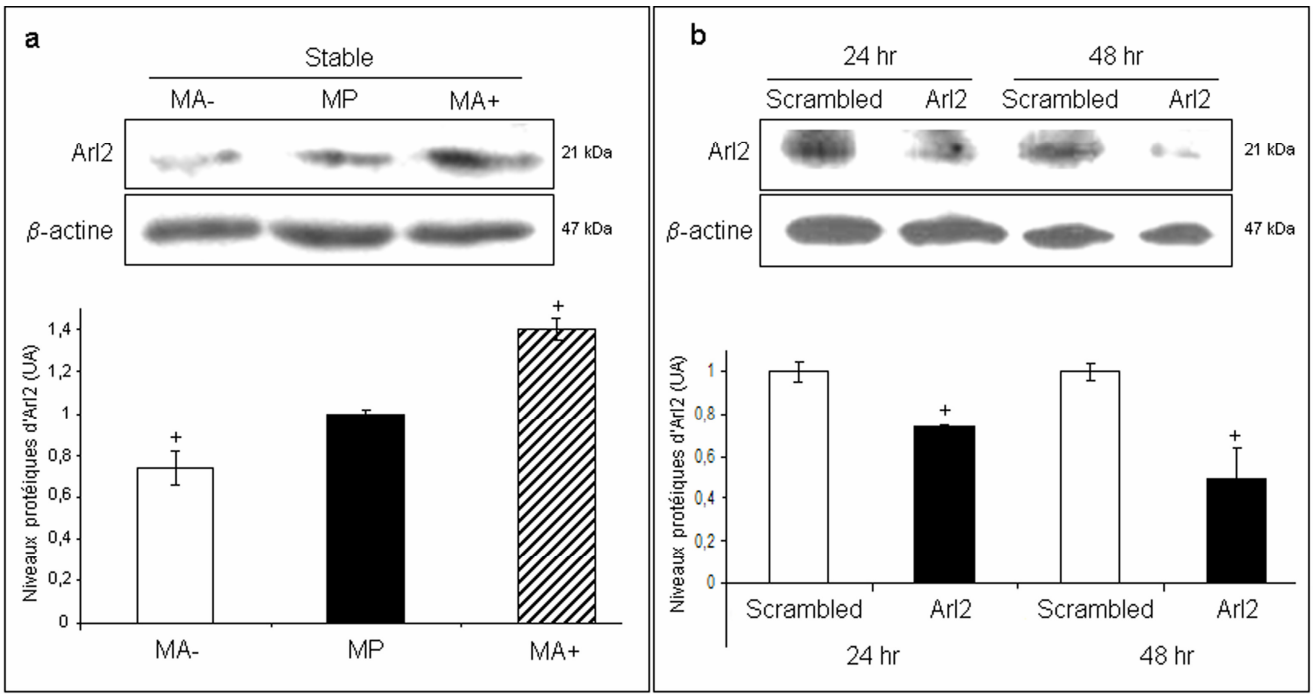


Figure 17 : Les niveaux d'expression d'Arl2 dans les cellules transfectées MCF7. a : Western-Blot représentatifs correspondant à Arl2 et à la β-actine (en haut) et moyennes des niveaux d'expression de la protéine Arl2 (en bas) dans les modèles dérivés des cellules MCF7 transfectées stablement avec l'antisens (MA-), avec le vecteur vide pcDNA3 (MP) ou avec la séquence codante complète d'Arl2 (MA+). b : Western-Blot représentatifs correspondant à Arl2 et à la β-actine (en haut) et moyennes des niveaux d'expression de la protéine Arl2 (en bas) dans les modèles dérivés des cellules MCF7 transfectées transitoirement avec le siARN témoin (scrambled) ou avec le siARN ciblant Arl2 (Arl2). Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

5.2.3. L'expression d'Arl2 influence l'équilibre entre hétérodimères polymérisables d'αβ-tubuline et les tubulines non polymérisables

Selon l'implication précédemment décrite d'Arl2 dans la régulation de la mise en conformation des tubulines, nous avons supposé que des modifications de l'expression d'Arl2 pourraient entraîner des modifications de l'équilibre entre hétérodimères polymérisables d'αβ-tubuline et les tubulines non polymérisables contenant les tubulines complexées des cofacteurs tels que TBC-D. Une augmentation de la protéine Arl2 devrait entraîner une augmentation de la fraction polymérisable des hétérodimères de tubulines, alors qu'une diminution de la protéine Arl2 pourrait entraîner une diminution de cette fraction.

Les révélations des immunoblots n'ont montré aucune différence entre les niveaux totaux d'expression des protéines α- et de β-tubulines des 3 lignées cellulaires MP, MA- et MA+ (figure 18a). Les techniques précédemment utilisées pour la séparation des différentes fractions de tubulines ont été effectuées dans le but d'extraire et de purifier uniquement la fraction microtubulaire sans prendre en compte les différentes fractions solubles de tubulines (Newton *et al.*, 2002, Sillje *et al.*, 2006). Pour notre étude, nous avons conservé les surnageants provenant de la première ultracentrifugation contenant les tubulines polymérisables solubles (voir matériels et méthodes). Ces surnageants ont ensuite subi un cycle de polymérisation en présence de GTP et une ultracentrifugation afin de séparer les hétérodimères de tubulines solubles polymérisables (ayant subi la voie complète de mise en conformation) et les tubulines solubles non polymérisables (figure 18b). Nous avons alors évalué la quantité de tubulines en utilisant un anticorps anti β-

tubuline par Western Blot dans les différentes fractions : tubulines non-polymerisables (NPT), tubulines polymerisables (PT) et microtubules (MT) (figure 2c). Les cellules MA- présentaient une augmentation significative de la fraction NPT ($p<0.05$, +18%) et une diminution significative de la fraction PT ($p<0.05$, -30%) en comparaison avec les cellules MP. A l'inverse, les cellules MA+ avaient un contenu en NPT significativement diminué ($p<0.05$, -22%) et un contenu en PT significativement augmenté ($p<0.05$, +45%) en comparaison avec les cellules MP. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée pour la fraction microtubulaire entre les 3 lignées cellulaires. Des résultats similaires ont été observés après coloration des fractions au gel d'argent (figure 18b).

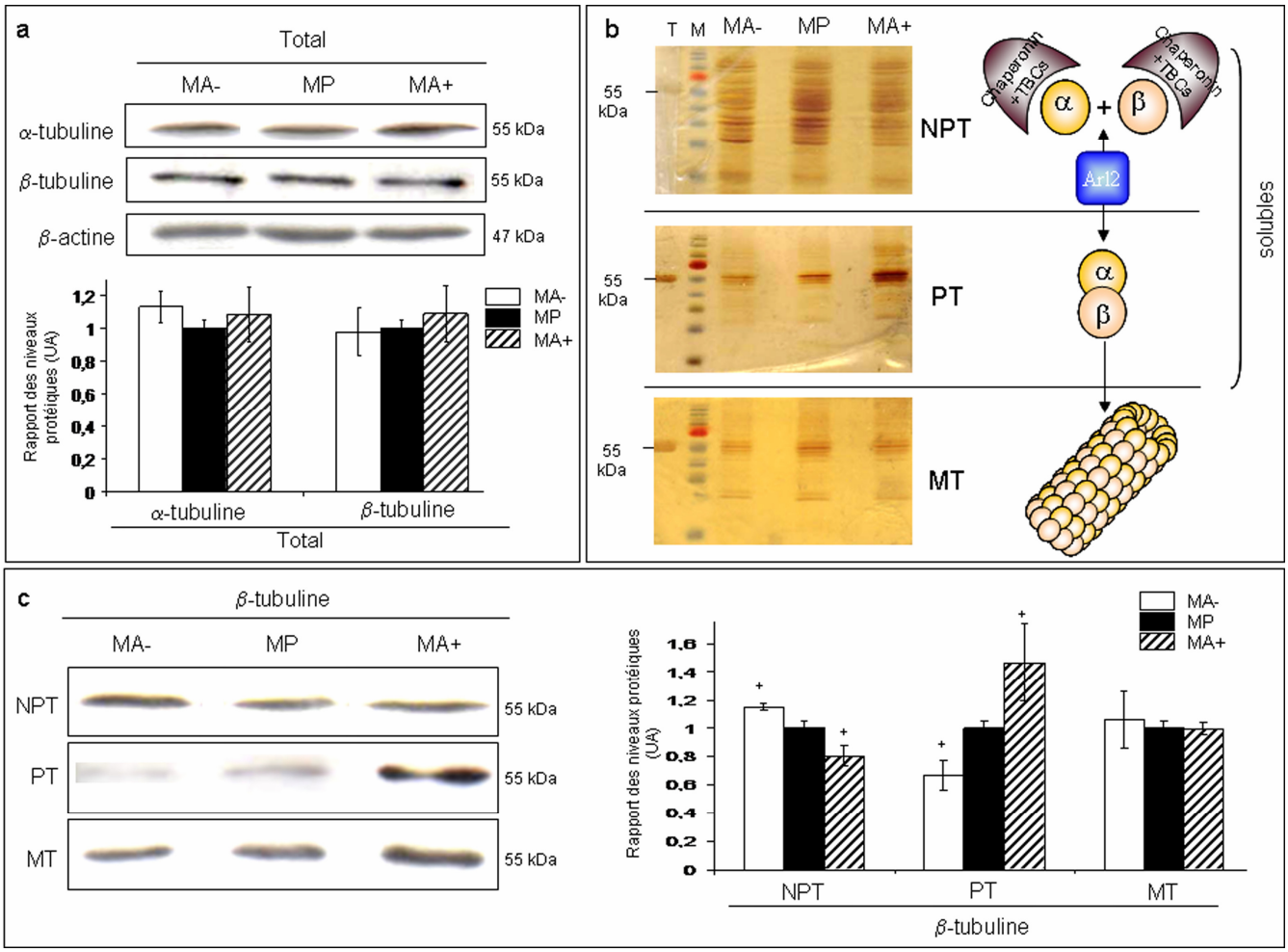


Figure 18 : Détermination des fractions de la β-tubuline des cellules MA-, MP, MA+. a : Western-Blot représentatifs et moyennes des niveaux d'expression de l'α- et de la β-tubuline dans des extraits de protéines totales. b : Coloration d'un gel à l'argent représentatif correspondant de chaque fraction des tubulines (T : tubuline purifiée commerciale (Cytoskeleton Inc., USA), M : marqueur protéique (Fermentas, Canada)). La standardisation des échantillons a été effectuée en ajustant la concentration de protéines totales dans les différentes fractions avant de procéder au cycle de polymérisation et de dépolymérisation (voir matériels et méthodes). Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

5.2.4. La dynamique des microtubules des cellules vivantes est modulée par le niveau d'expression de la protéine Arl2

La figure 19a présente une séquence d'images d'une région périphérique d'une cellule MP vivante après microinjection de tubulines-rhodamine. Les extrémités plus de microtubules, indiquées par les flèches, alternent entre phases de croissance, phases de décroissance et état d'atténuation (ou pause). Les capacités dynamiques de microtubules individualisés évaluées dans les cellules vivantes MP, MA- et MA+ sont représentées dans la figure 19b (courbes de suivi en temps réel (life-histroy plots)). Des courbes de suivi d'au moins 50 microtubules appartenant à au moins 10 cellules différentes ont été établies pour déterminer les paramètres de l'instabilité dynamique des microtubules pour chaque lignée cellulaire (tableau 9).

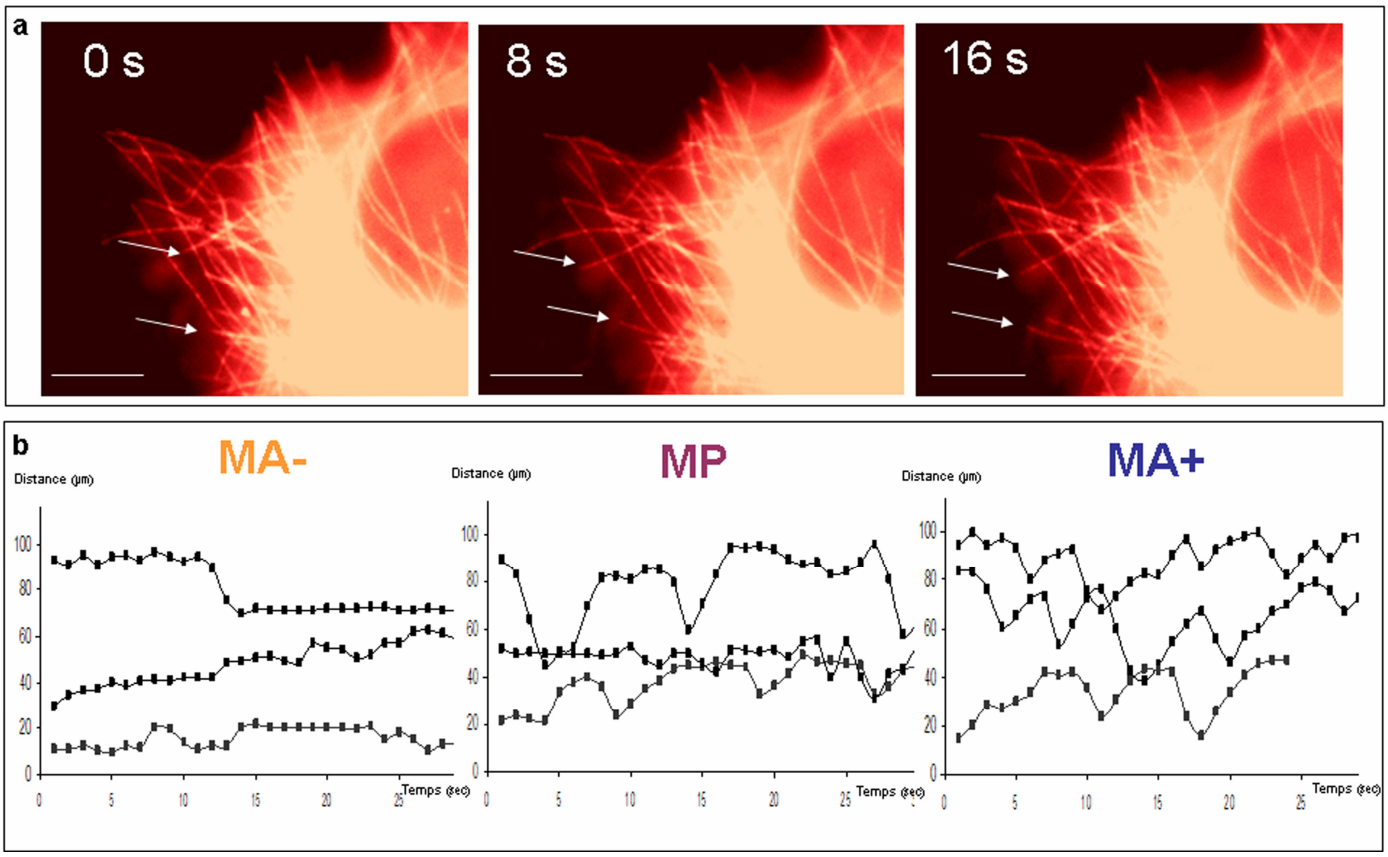


Figure 19 : Comparaison des propriétés dynamiques des microtubules des cellules MA-, MP et MA+. a : séquence en temps réel des extrémités microtubulaires d'une cellule MP. Les barres d'échelle correspondent à 5µm. b : courbe de suivie correspondant aux variations de longueurs au cours du temps de 3 microtubules représentatifs pour chaque lignée cellulaire MA-, MP, MA+.

Tableau 9 : Paramètres de la dynamique microtubulaire des cellules MA-, MP et MA+.

				Pourcentages de différences		
Paramètres	MA-	MP	MA+	entre MA-/MP	entre MA+/MP	entre MA+/MA-
Vitesses moyennes (µm.min-1)						
Croissance	10,8	11,8	[c]13,5*	-8,47%	15,58%	26,27%
Décroissance	14,2+	16,5	[c]18,5	-13,54%	12,69%	30,34%
Durées moyennes (min)						
Croissance	0,13*	0,19	[b]0,17	-31,58%	-10,53%	30,77%
Décroissance	0,12*	0,15	0,14	-20,00%	-6,67%	16,67%
Atténuation	0,29*	0,22	[c]0,18	31,82%	-18,18%	-37,93%
Pourcentage de temps passé en :						
Croissance	21,7	34,9	42,3	-37,73%	21,14%	94,53%
Décroissance	15,7	20,5	23,8	-23,25%	16,08%	51,24%
Atténuation	62,5	44,5	33,8	40,34%	-24,03%	-45,87%
Fréquences de transition (min-1)						
Catastrophe	1,6	1,8	[a]2,3	-9,60%	29,38%	43,13%
Sauvetage	7,4	5,9	[b]6,9	24,25%	14,73%	-7,66%
Dynamicité (µm.min-1)						
	4,6	7,5	10,2	-38,75%	35,82%	121,74%

La signification statistique a été évaluée par le t-test de Student (+ : p <0.05, * p <0.01 , * : p <0.001 entre les cellules MA- ou MA+ et MP, [a] : p <0.05, [b] : p <0.01, [c] : p <0.001 entre les cellules MA- et MA+).

Nous avons observé que la moyenne des vitesses de croissance des microtubules est significativement augmentée ($p<0.01$, +15%) dans les cellules MA+ par rapport aux cellules MP, alors que ce taux de croissance est diminué dans les cellules MA- (-8%), résultant en une diminution significative ($p<0.001$, -26%) par rapport aux cellules MA+. La moyenne des vitesses de raccourcissement des microtubules est augmentée dans les cellules MA+ et diminuée dans les cellules MA- en comparaison avec les microtubules des cellules MP. Ceci résulte également en une augmentation significative de ce taux de raccourcissement ($p<0.001$, +30%) entre les microtubules des cellules MA- et MA+. Aucune différence significative n'a été observée entre les moyennes des durées de chaque phase (croissance, raccourcissement et atténuation) des microtubules des cellules MA+ et MP. Cependant, en termes de pourcentage de temps passé dans chaque phase, les microtubules des cellules MA+ passent moins de temps en pause que ceux des cellules MP (-24%). Ceci est accompagné d'une augmentation du pourcentage de temps passé en phases de croissance et raccourcissement. Les moyennes des durées des phases de croissance et de raccourcissement des microtubules des cellules MA- sont significativement diminuées par rapport à ceux des cellules MP. Cela est accompagné d'une augmentation significative de la moyenne de temps passé en atténuation ($p<0.01$, +32%) par rapport aux microtubules des cellules MP. Ces différences ont également été observées au niveau des pourcentages de temps passé dans chaque phase avec une augmentation de 40% du pourcentage de temps passé en pause pour les microtubules des cellules MA- par rapport à ceux des cellules MP.

Les fréquences de catastrophes et de sauvetages calculées par minute ne sont pas apparues significativement différentes entre les microtubules des cellules

MP et ceux des cellules MA- ou ceux des cellules MA+. Cependant, une augmentation significative des fréquences de catastrophes ($p<0.05$, +43%) entre les microtubules des cellules MA+ et ceux des cellules MA- a été observée. Enfin, la dynamicité des microtubules est augmentée de 36% dans les cellules MA+ et diminuée de 39% dans les cellules MA- comparée aux microtubules des cellules MP, ce qui correspond à une différence de 122% entre les microtubules des cellules MA- et ceux des cellules MA+.

Ces résultats démontrent que les vitesses de croissance et raccourcissement, les pourcentages de temps passé en croissance et décroissance, la fréquence de catastrophes et la dynamicité globale sont positivement associés avec le contenu en protéine Arl2. La moyenne des durées des phases des pauses et le pourcentage de temps passé en pause sont inversement corrélés avec le niveau d'expression protéique d'Arl2.

5.2.5. Arl2 régule le contenu protéique de TBC-D et le niveau protéique, la localisation et l'activité de PP2Ac

Des expériences de RT-PCR en temps réel ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative du niveau d'expression des ARNm codant pour le Tubulin Binding Cofactor D (TBC-D) et pour la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase PP2A (PP2Ac) entre les lignées des cellules MP, MA+ et MA- (figure 20a). A l'inverse, le niveau d'expression protéique de TBC-D est significativement augmenté ($p<0.05$, +130%) dans les cellules MA+ par rapport aux cellules MP. Des analyses en Western Blot des différentes fractions de tubulines (NPT, PT, MT) ont montré que la protéine TBC-D n'est détectable qu'au niveau de la fraction non-polymérisable des tubulines (NPT) pour les 3 lignées cellulaires (données non

représentées). Les niveaux d'expression de la protéine PP2Ac sont significativement plus élevés ($p<0.05$, +35%) dans les cellules MA+ et significativement plus faibles ($p<0.05$, -34%) dans les cellules MA- par rapport aux cellules MP (figure 20b). Les différences observées au niveau de l'expression de PP2Ac ont été obtenues pour l'ensemble de nos lignées cellulaires (MA-, MP, MA+; MDAA-, MDAP, MDAA+ ; MDAA-luc, MDAPluc, MDAA+luc ; HA-, HP, HA+).

Comme PP2A est en partie liée aux microtubules (Tar *et al.*, 2004), nous avons également effectué les révélations PP2Ac sur les fractions de tubulines NPT, PT et microtubules de tubulines. Aucune différence n'a été observée dans la répartition de PP2Ac dans les différentes fractions de tubulines entre les 3 lignées cellulaires MA-, MP et MA+ (données non représentées).

Ces résultats suggèrent qu'Arl2 influence le contenu protéique de PP2Ac et de TBC-D par un mécanisme traductionnel ou post-traductionnel qui peut être indépendant des microtubules.

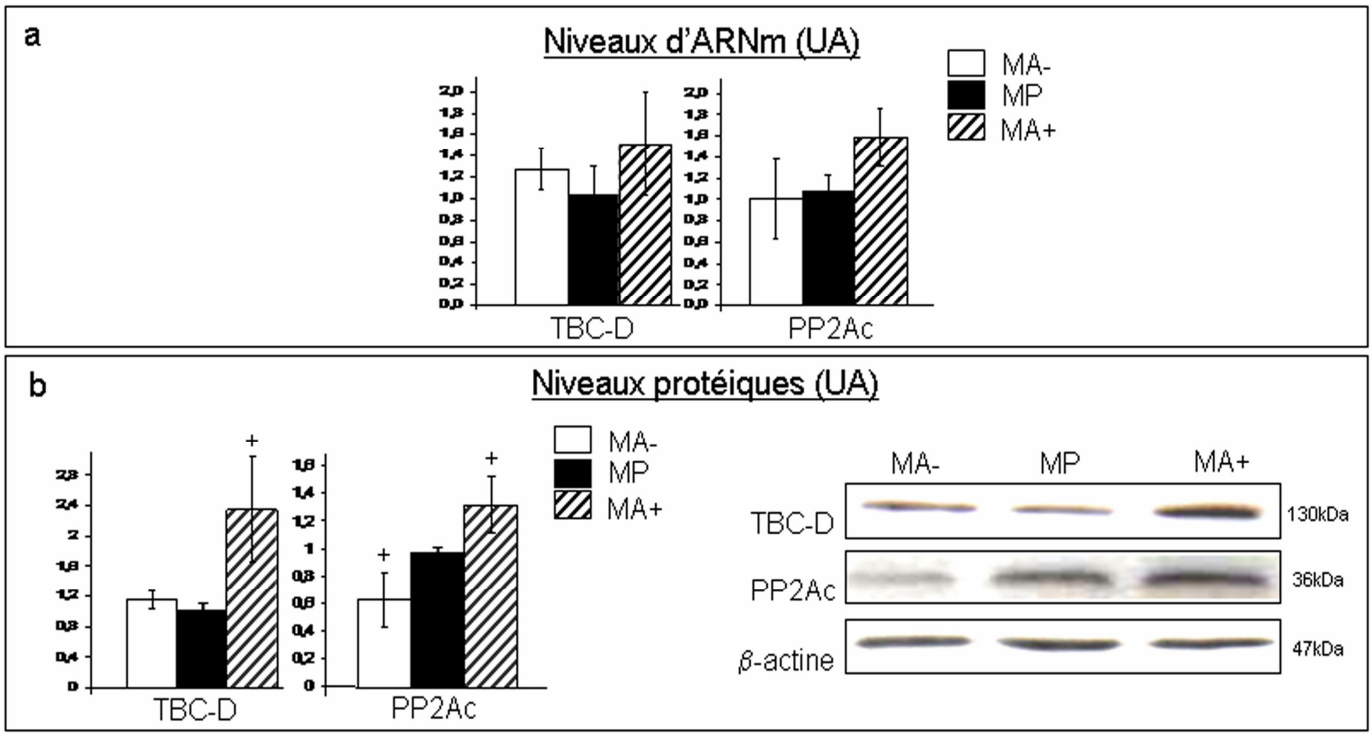


Figure 20 : Niveaux d'expression du Tubulin Binding Cofactor D (TBC-D) et de la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 2A (PP2Ac) dans les cellules MA-, MP et MA+. a : moyennes des niveaux d'expression de des ARNm codant pour TBC-D et PP2Ac déterminés par RT-PCR quantitative en temps réel exprimées en unités arbitraires (UA). b : moyennes des niveaux d'expression protéiques (gauche) correspondant à TBC-D et à PP2Ac dans des extraits de protéines totales exprimées en unités arbitraires (UA) et western-blot correspondant représentatif (droite). Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

Pour déterminer l'impact d'Arl2 sur l'activité de PP2A, nous avons mesuré son activité de thréonine-phosphatase dans nos différents modèles cellulaires MA-, MP et MA+. Nous avons observé que, pour une même quantité de protéines PP2Ac immunoprécipitées (évaluées par Western-Blot après l'immunoprécipitation), l'activité de PP2Ac extraites des cellules MA- était 2 fois supérieure ($p<0.05$) à celle de PP2Ac extraites des cellules MP et des cellules MA+ (figure 21). Par conséquent, Arl2 semble influencer l'activité de déphosphorylation de PP2A. Enfin, nous avons effectué des tests d'immunolocalisation de PP2Ac au sein de nos cellules MP, MA- et MA+ (figure 21) et avons observé que PP2Ac était, de façon similaire, majoritairement cytoplasmique dans les 3 lignées cellulaires. Cependant, pour les cellules MA+ uniquement, nous avons également observé qu'une fraction nucléolaire de PP2Ac était détectable (flèches blanches, figure 21). Ces résultats suggèrent qu'Arl2 influence également la localisation et l'adressage nucléolaire de PP2A.

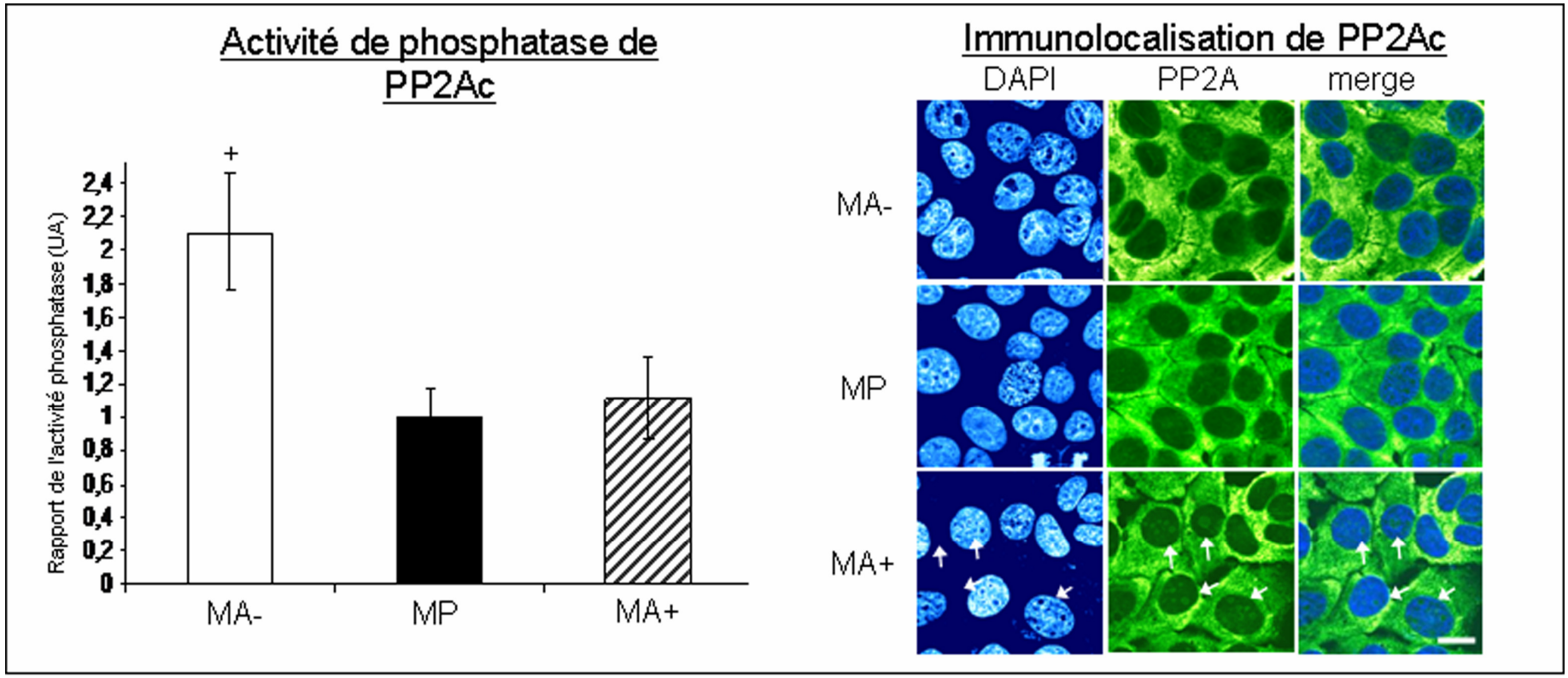


Figure 21 : Activité et localisation de PP2Ac dans les cellules MA-, MP et MA+. Moyennes de l'activité phosphatase de PP2Ac dans des extraits totaux protéiques exprimées en unités arbitraires (UA) (gauche) et images représentatives de chaque lignée cellulaire après marquage de l'ADN au DAPI (bleu) et de PP2Ac (vert). Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les barres d'échelle correspondent à 15µm, les flèches blanches indiquent une localisation nucléolaire de PP2Ac (observée uniquement pour les cellules MA+). Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

5.2.6. Le niveau d'expression d'Arl2 modifie la morphologie cellulaire

Comme la morphologie cellulaire est dépendante en partie du cytosquelette microtubulaire, la morphologie des nos cellules a été évaluée par immunocytochimie en utilisant un anticorps anti β–tubuline couplé au FITC et une contrecoloration au DAPI (figure 22a). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'anticorps anti α-tubuline (données non représentées). Grâce à l'analyse par le logiciel ImageJ, nous avons observé que les cellules MA+ occupaient 20 à 25% de surface en plus ($p<0.05$) et que les cellules MA- occupaient 25 à 30% de surface en moins ($p<0.05$) que les cellules MP. Ces résultats ont été confirmés à différentes conditions d'ensemencement (données non représentées).

De la même façon, 48 heures après transfection de siARN ciblant Arl2, nous avons observé une diminution significative de l'étalement cellulaire ($p<0.05$, -60%) en comparaison avec les cellules transfectées avec le siARN témoin scrambled (figure 22b). Par conséquence, une inhibition transitoire du contenu en protéine Arl2 entraîne des modifications rapides de la morphologie cellulaire.

Le contenu en protéine Arl2 est donc corrélé avec l'étalement de cellules de cancer du sein.

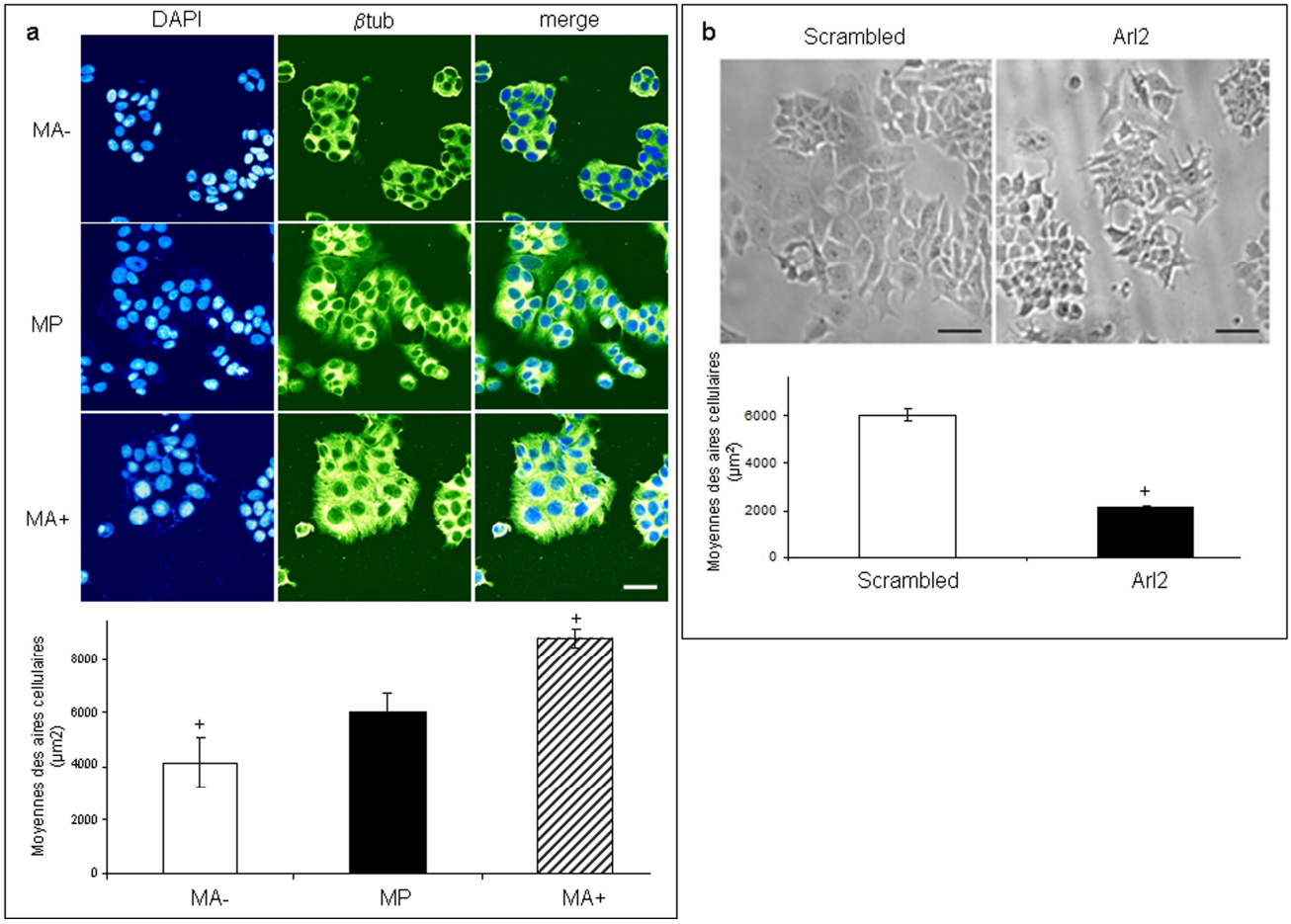


Figure 22 : Analyses morphologiques des cellules selon le niveau d'expression d'Arl2. a : images représentatives de chaque lignée cellulaire après marquage de l'ADN au DAPI (bleu), de la β-tubuline (βtub, vert) et moyennes des aires cellulaires (µm2) évaluées par microscopie confocale pour au moins 200 cellules sur au moins 3 images différentes. Les barres d'échelle correspondent à 30 µm. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. b : images représentatives des cellules MCF7 après 48 heures de transfection avec un siARN témoin (scrambled) ou avec un siARN anti Arl2 (Arl2) et moyennes des aires cellulaires (μm^2) évaluées par microscopie pour au moins 200 cellules sur au moins 3 images différentes. Les barres d'échelle correspondent à 30 µm. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

5.2.7. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la progression mitotique et cytokinétique

La dynamique microtubulaire est un élément essentiel au bon déroulement de la mitose. Nous avons donc étudié la distribution en cycle cellulaire des cellules MA-, MP et MA+ en phase exponentielle de croissance par cytométrie de flux (figure 23a). Les cellules MA- présentaient un pourcentage significativement ($p<0,05$) plus faible de cellules en phase G2/M (7.8%) comparées aux cellules MP (12%) alors que les cellules MA+ présentaient une fraction de cellules en G2/M plus élevée (15.8%). Comme nous n'avons relevé aucune différence dans la vitesse de prolifération des 3 lignées cellulaires (figure 23b), ces résultats suggèrent que les cellules MA- pourraient subir une transition G2 à M plus rapide et passer moins de temps en phase G2 que les cellules MP. A l'inverse, les cellules MA+ pourraient avoir une transition G2/M ralentie par rapport aux autres cellules.

Les indices mitotiques, ana-télophasiques et cytokinétiques ont été évalués en utilisant l'analyse microscopique. Nous avons observé des pourcentages de cellules mitotiques et ana-télophasiques significativement ($p<0.05$) plus élevés pour les cellules MA+ (4.2% et 1%) que pour les cellules MP (2.4% et 0.1%). Les cellules MA- présentaient des indices mitotiques et ana-télophasiques similaires à ceux des cellules MP (figure 23c).

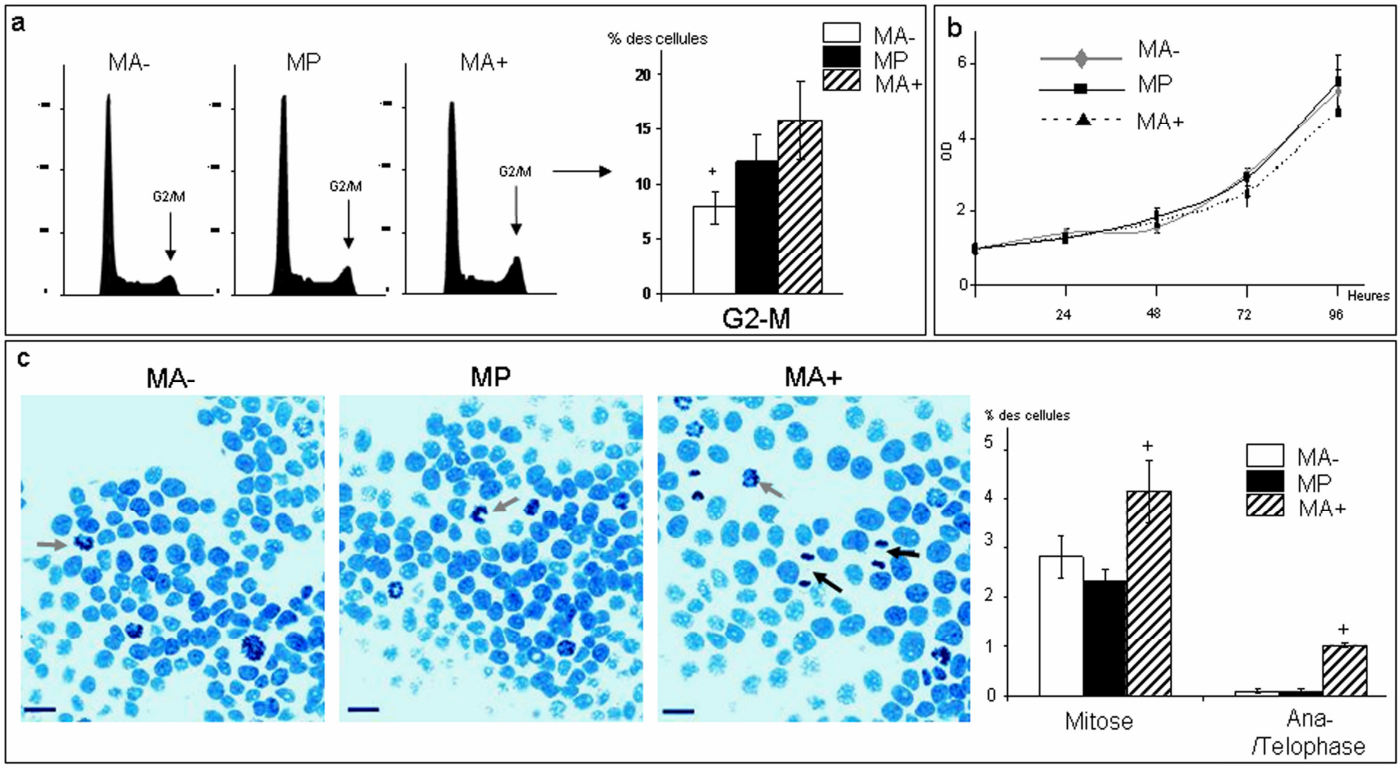


Figure 23 : Distribution en cycle cellulaire, indices mitotiques et ana-/telophasiques vitesses de prolifération des cellules MA-, MP et MA+. a : distributions en phases G0/G1, S et G2/M déterminées par cytométrie de flux (gauche : graphes représentatifs, droite : moyennes des pourcentages des cellules en phase G2/M). b :moyennes des vitesses de proliferation évaluées par le test MTT et exprimée en unité de densité optique (DO) par heure. c : indices mitotiques et ana-/telophasiques évalués en microscopie confocale pour 600 cellules sur au moins 3 images différentes (gauche : images représentatives, droite : moyennes des pourcentages des cellules mitotiques et ana-/telophasiques). Les barres d'échelle correspondent à 20 µm, les flèches noires marquent les cellules ana-/télophasiques et les flèches grises les cellules pro-/métaphasique. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

Pour quantifier l'indice cytokinétique de nos cellules, nous avons utilisé un double marquage α-tubuline-FITC et DAPI afin de mettre en évidence la formation de ponts cytoplasmiques intercellulaires fins enrichis en microtubules (microtubules du corps intermédiaire et du faisceau du sillon) avec présence d'un anneau central contractile d'actomyosine non marqué à l'α-tubuline, structures spécifiques de la cytokinèse (figure 24). Nous avons trouvé un pourcentage de cellules cytokinétiques significativement plus élevé ($p<0.05$, 12%) dans les cellules MA+ par rapport aux lignées MP et MA-. Il est à noter que les cellules cytokinétiques ne sont probablement pas comptabilisées dans la phase G2/M en cytométrie de flux car le pont cytoplasmique reliant les 2 cellules filles en cytokinèse est assez fragile et la cytométrie en flux nécessite un traitement relativement agressif pour mettre en solution des cellules adhérentes.

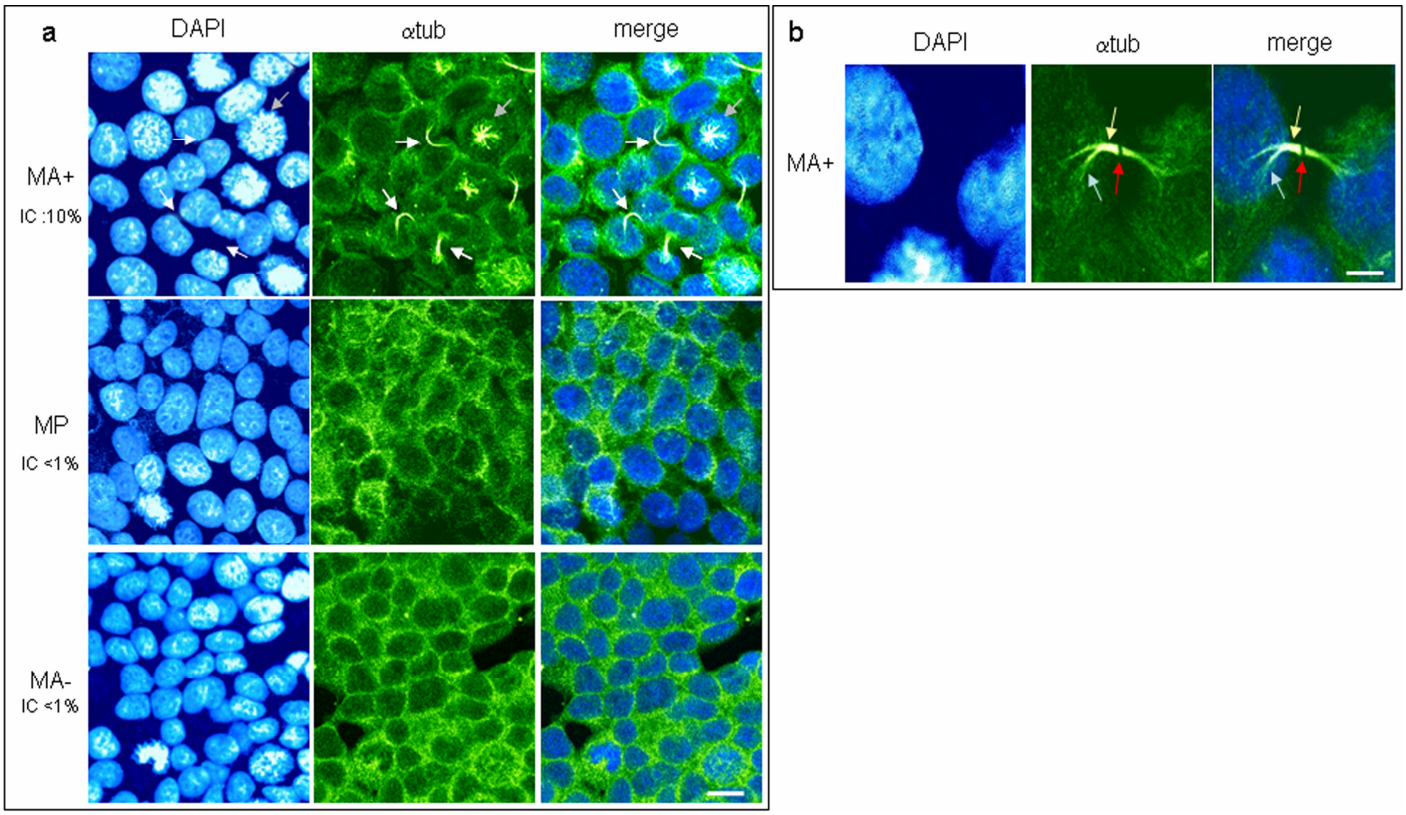


Figure 24 : Indices cytokinétiques (IC) des cellules MA-, MP et MA+. a : images représentatives de chaque lignée cellulaire après marquage de l'ADN au DAPI (bleu), de la α-tubuline (αtub, vert). Les moyennes des indices cytokinétiques (IC) sont évaluées par microscopie confocale pour 600 cellules sur au moins 3 images différentes. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm, les flèches blanches marquent les cellules cytokinétiques et les flèches grises les cellules mitotiques. b : agrandissement de cellules MA+ cytokinétiques. La flèche bleu clair marque le faisceau de microtubules du sillon, la flèche jaune les microtubules du corps intermédiaire et la flèche rouge l'anneau contractile d'actomyosine (absence de marquage au milieu des microtubules du corps intermédiaire). Les barres d'échelle correspondent à 5 µm.

Afin d'évaluer le temps passé en chaque phase de mitose de nos cellules, nous avons procédé en l'observation microscopique longue (15h) en temps réel des cellules vivantes (figure 25a). Seules les mitoses complètes observées pendant le temps de l'observation ont été analysées. Aucune différence significative de la durée totale des mitoses n'a été observée entre les 3 lignées cellulaires MP, MA-, MA+ (figure 25b). Néanmoins, nous avons observé la présence de mitoses avortées ou bloquées en télophase/cytokinèse pour les cellules MA+ mais pas pour les cellules MP ni MA- (données non représentées). Ces cellules n'ont pas été comptabilisées pour l'évaluation des durées des différentes phases mais sont probablement comptabilisées dans le pourcentage de la phase G2/M des cellules MA+. De plus, nous avons observé une diminution significative ($p<0.05$, -40 min) du temps passé en pro- et métaphase pour les cellules MA+ par rapport aux cellules MP et MA- (figure 25c). Nous avons également observé une augmentation significative ($p<0.05$, +50 min) des durées des ana- et télophases des cellules MA+ par rapport aux cellules MP et une diminution significative ($p<0.05$, -15 min) des durées de ces phases dans les cellules MA- par rapport aux 2 autres lignées. Des différences identiques ont été observées dans les cellules transfectées MDA-MB-231. Les cellules MDAA+ présentaient une diminution significative de la durée des pro- et métaphases et une durée de télophase significativement augmentée par rapport aux cellules MDAP (données non représentées).

Ces données montrent que le contenu en Arl2 est corrélé à des altérations significatives de la progression mitotique. Un niveau d'Arl2 élevé est associé avec une diminution de la durée des pro- et métaphases, avec des télophases prolongées et des mitoses avortées alors qu'au niveau bas d'Arl2 est associé avec une télophase plus rapide.

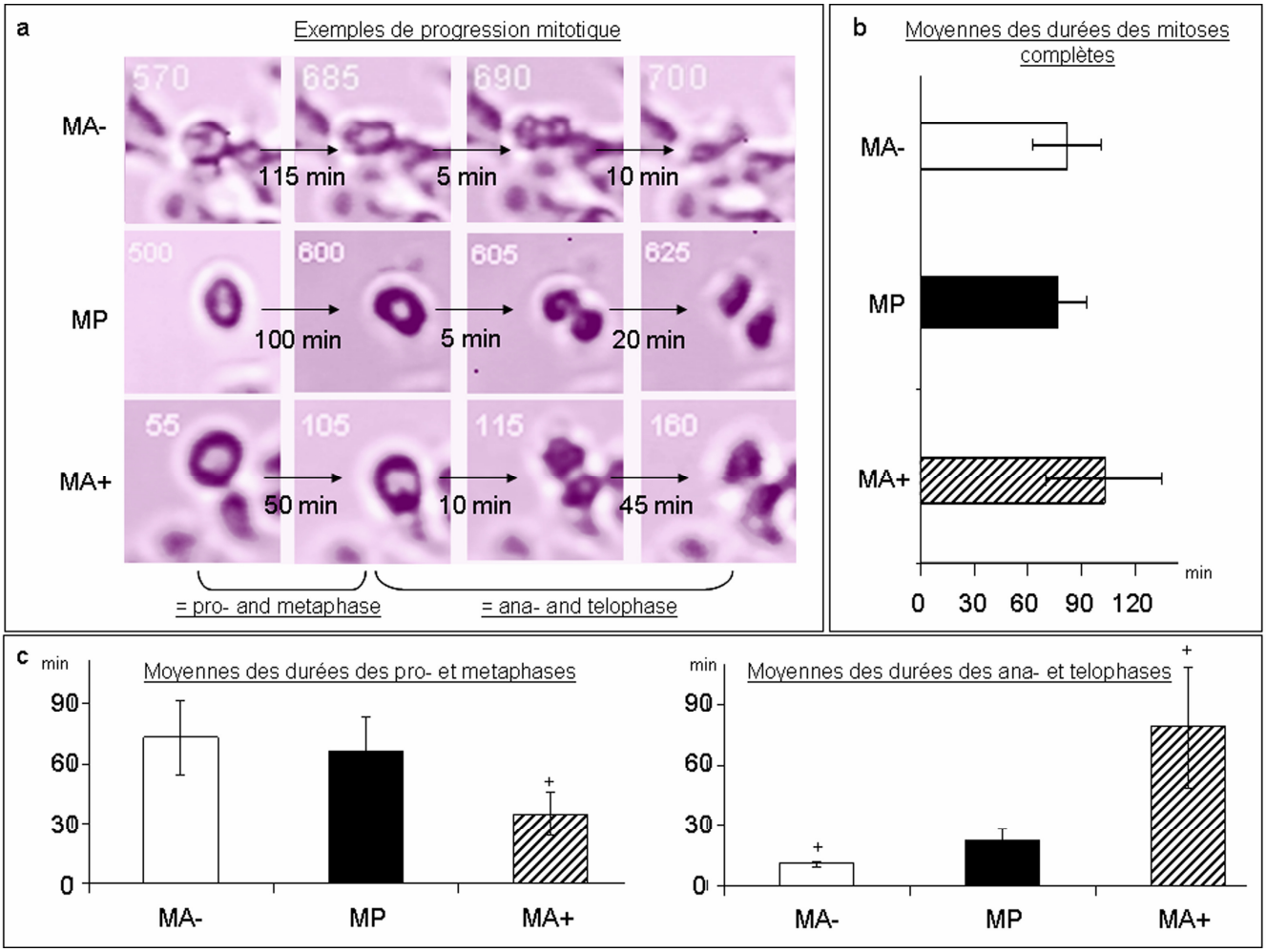


Figure 25 : Progression mitotique des cellules vivantes MA-, MP et MA+. a : images représentatives et durées correspondantes de la progression mitotique ; première colonne : début de la prophase, deuxième colonne : début de l'anaphase, troisième colonne : début de la télophase et cytokinèse, quatrième colonne : fin de la mitose (re-adhesion cellulaire). b : moyennes des durées totales des mitoses en minutes. c : moyennes des durées des pro- et metaphase (gauche) et des télophases (droites) en minutes. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

5.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que le niveau d'expression de la protéine Arl2 influence fortement la morphologie cellulaire (plus particulièrement l'étalement cellulaire), la distribution des fractions de tubulines solubles, la dynamique microtubulaire et la progression du cycle cellulaire dans 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome mammaire.

Arl2-GDP a été précédemment décrite comme interagissant avec TBC-D, cofacteur essentiel de la mise en conformation de la β-tubuline et de la dissociation de l'hétérodimère d'αβ-tubulines. Lors d'expériences de surexpression de TBC-D, le réseau microtubulaire est détruit et la cosurexpression d'Arl2 permet de récupérer l'intégrité du réseau microtubulaire (Bhamidipati *et al.*, 2000). Nous avons montré que de faibles variations dans l'expression d'Arl2 avaient des conséquences significatives sur le contenu des différentes fractions de tubulines solubles. Ceci s'explique par l'impact d'Arl2 sur l'activité de TBC-D précédemment décrit.

Nous avons également mis en évidence une corrélation entre les contenus protéiques en Arl2 et TBC-D. Shern *et al.* ont décrit l'existence d'un complexe Arl2/TBC-D/PP2A mais que les rapports stochiométriques entre chacun des partenaires du complexe restaient incertains et les auteurs n'ont pas exclu la possibilité qu'il y ait plusieurs types de complexes. La taille du complexe a été évaluée approximativement à 270-300kDa, ce qui peut correspondre à une molécule de chaque partenaire mais aussi à 2 molécules de TBC-D associées à une molécule d'Arl2. Nous pensons qu'il peut exister plusieurs types de complexes pouvant expliquer l'augmentation relativement importante de TBC-D par rapport à celle d'Arl2 dans les cellules MA+.

Zhou *et al.* ont précédemment montré que l'expression d'un mutant d'Arl2 ne pouvant se lier qu'au GTP (mutant inactif pour l'activité GTPasique) provoquait une perte du réseau microtubulaire et un arrêt en mitose (Zhou *et al.*, 2006). Nous avons surexprimé une forme sauvage d'Arl2 pouvant potentiellement à la fois se lier au GTP et l'hydrolyser. Par conséquent, une partie de nos résultats peut être expliquée par le même mécanisme suggéré par les résultats de Zhou (c'est-à-dire par la présence d'Arl2-GTP). De plus, comme Arl2 et Arl3 sont très proches et partagent les mêmes partenaires (Hanzal-Bayer *et al.*, 2002) et qu'Arl3 semble influencer la morphologie cellulaire et les mécanismes de modifications post traductionnels de la tubuline (Zhou *et al.*, 2006), nous ne pouvons pas totalement exclure que les modifications observées dans nos modèles soient indépendants d'Arl3. Cependant, nous avons procédé à l'analyse du niveau d'expression de l'ARNm codant pour Arl3 (et Arl1) par RT-PCR en temps réel et nous n'avons observé aucune différence significative de ce niveau entre les cellules MA-, MP et MA+ (données non représentées).

Nous avons montré que des changements du contenu en protéine Arl2 provoquaient d'importantes modifications de la dynamique des microtubules. Des paramètres tels que la polymérisation, la longueur des phases de croissance, le pourcentage de temps passé en phase de décroissance et la fréquence de catastrophes ont été décrits comme dépendants de la concentration en hétérodimères de tubulines polymérisables (Chretien *et al.*, 1995, Walker *et al.*, 1988). Nous avons observé des modifications de ces paramètres dans nos modèles corrélées à des modifications de la concentration en hétérodimères de tubulines polymérisables. Cependant, le taux de décroissance des microtubules, qui est altéré dans nos lignées, n'est pas dépendant de cette concentration en tubulines

polymérisables. Ceci peut être expliqué par le niveau d'expression, l'activité et/ou la localisation modifiés de PP2A dans nos cellules. PP2A est une phosphatase importante influençant des protéines impliquées dans la séquestration et la polymérisation de la tubuline, telles que TAU, MAP1, MAP2 et Op18, protéines exprimées dans les cellules du cancer du sein (Mimori *et al.*, 2006, Rouzier *et al.*, 2005, Tournebize *et al.*, 1997, Veitia *et al.*, 1998, Wagner *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent qu'Arl2 pourrait être considérée comme une sous-unité régulatrice de PP2A en influençant la localisation et l'activité de PP2A. Nous avons mesuré l'activité de PP2A en utilisant un phosphopeptide de 6 acides aminés. L'activité et l'affinité de PP2A et du complexe PP2A/Arl2 pour des protéines spécifiques n'ont pas encore été évaluées.

Par la tranfection de siARN anti Arl2, nous avons observé des modifications de la morphologie cellulaire semblables à celles observées par transfection stable d'un antisens d'Arl2. Il est maintenant bien établi que le cytosquelette influence la morphologie cellulaire et nos résultats suggèrent que ces altérations morphologiques seraient une conséquence des altérations des propriétés des microtubules observées. De plus, ces résultats suggèrent que les observations faites sur des modèles transfectés stablement sont directement corrélées avec le niveau d'expression d'Arl2. Ces résultats contredisent en partie ceux de Zhou *et al.* qui n'ont montré aucune différence significative de la morphologie cellulaire dans des cellules Hela ayant différents niveaux d'expression d'Arl2 (Zhou *et al.*, 2006). Comme les cellules Hela ont une morphologie plus allongée que les cellules MCF7, cela peut être assez difficile de détecter des différences morphologiques précises induites après modifications du niveau d'Arl2.

Dans les cellules Hela, Zhou *et al.* ont montré qu'Arl2 était localisée au niveau des centrosomes tout au long du cycle cellulaire et peut ainsi être disponible pour participer à la croissance et à la régulation des microtubules interphasiques et du fuseau mitotique. Nos résultats ont montré que les cellules avec une surexpression d'Arl2 présentaient des durées de prophase/métaphase raccourcies et une augmentation du temps passé en anaphase/télophase conduisant dans certain cas à des mitoses avortées. Comme les durées totales des mitoses et les proliférations cellulaires restaient similaires entre les lignées cellulaires, cela semble étonnant d'obtenir des différences dans le pourcentage de cellules en G2/M en cytométrie de flux. Une explication possible est l'altération de la dynamique microtubulaire. A la transition entre la phase G2 et la prophase, une diminution importante de la masse des microtubules est décrite au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Comme les cellules MA- ont un plus faible contenu en hétérodimères de tubulines polymérisables, il est possible que ces cellules subissent une forte diminution de la masse de polymères plus rapidement que les cellules avec un contenu en Arl2 et tubulines polymérisables plus importants. Ceci résulterait en une phase G2 plus courte, correspondant aux différences observées par cytométrie de flux mais indétectable par le marquage au DAPI ou par l'observation en temps réel des cellules. La nécessité d'avoir une dynamique microtubulaire élevée pour permettre l'alignement correct et la ségrégation des chromosomes en métaphase/anaphase est illustrée par les cellules MA+ qui ont la plus grande dynamicité microtubulaire et la transition métaphase/anaphase la plus rapide. Il a précédemment été publié qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une dynamique microtubulaire régulée de façon précise pour induire la phase de cytokinèse (Strickland *et al.*, 2005) qui nécessite cependant la séparation du corps intermédiaire par un anneau d'actomyosine. Comme les

cellules MA+ contiennent plus d'hétérodimères de tubulines polymérisables et comme les microtubules spécialisés du faisceau du sillon sont responsables du transport de vésicules membranaires vers le site de clivage cellulaire (sillon) (Straight *et al.*, 2000), ces cellules peuvent avoir soit une masse plus importante de microtubules au niveau du corps intermédiaire et/ou avoir une altération de l'incorporation des membranes au niveau du sillon. Dans les 2 cas, ceci entraînerait une contraction plus difficile de l'anneau d'actomyosine expliquant le retard et/ou le blocage de la télophase/cytokinèse et les mitoses avortées observées pour les cellules MA+. Une autre explication serait que les cellules ayant des différences de l'activité de PP2A auraient des différences dans le contenu en protéine active (déphosphorylée) Op18/stathmine, une phosphoprotéine régulatrice de la transition prophase/métaphase.

Ces données démontrent l'importance d'événements se déroulant avant la polymérisation des tubulines en microtubules fonctionnels.

6. LE CONTENU EN ARL2 INFLUENCE LA LOCALISATION DE P53 ET LA CHIMIOSENSIBILITE DE CELLULES DE CANCER DU SEIN.

6.1. Introduction

Nous avons montré dans une première partie qu'Arl2 avait un effet sur la dynamique des microtubules avec des répercussions sur le déroulement de la mitose. Egalement, nous avons montré un impact d'Arl2 sur l'expression et l'activité de la phosphatase PP2A connue pour être impliquée dans l'induction de l'apoptose (Van Hoof *et al.*, 2003). Comme nous l'avons rappelé, PP2A est capable de déphosphoryler un grand nombre de protéines comme p53 dont la liaison avec les microtubules et les centrosomes a été précédemment décrite (Giannakakou *et al.*, 2002, Giannakakou *et al.*, 2000, Tritarelli *et al.*, 2004). La protéine p53 est un facteur de transcription labile qui est activé et stabilisé en réponse à différents stress cellulaires comme les traitements chimiothérapeutiques.

De ce fait, nous avons étudié les phénomènes de chimiorésistances au sein de nos modèles dérivés de MCF7 en utilisant les agents anti microtubules taxol et vinorelbine et également en utilisant un analogue de nucléoside la gemcitabine (2_,2_-difluorodeoxycytidine) qui a montré une activité contre des pathologies hématologiques et des tumeurs solides tel que le cancer du sein (Heinemann, 2003).

6.2. Résultats

6.2.1. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques

Nous avons évalué le pourcentage de cellules en phase sub G0-G1 par cytométrie de flux (figure 26a). Les cellules non exposées contenaient moins de 5% de cellules en phase sub G0-G1 pour les lignées cellulaires MA-, MP et MA+. Après incubation des cellules avec du taxol ou avec de la vinorelbine, les cellules MA- présentaient une fraction de cellules en phase sub G0-G1 significativement plus faible que les cellules MP ($p<0.05$, respectivement -50% et -20%). A l'inverse les cellules MA+ avaient une population cellulaire présente en sub G0-G1 significativement plus importante que les cellules MP ($p<0.05$, respectivement +200%, +100%, +150%). Ces résultats ont été obtenus pour une échelle de concentration allant de 1 à 100 nM pour le taxol et la vinorelbine et allant de 0.1 à 10 µM pour la gemcitabine.

Nous avons aussi évalué le nombre de cellules vivantes après exposition à ces différents traitements (figure 26b). L'incubation des cellules MA+ avec le taxol résultait en un nombre de cellules vivantes moins important ($p<0.05$, -55%) que les lignées des cellules MP et MA-. Après incubation avec la vinorelbine, les cellules MA- présentaient un nombre de cellules vivantes plus important ($p<0.05$, +30%) et les cellules MA+ un nombre moins important ($p<0.05$, -28%) de cellules vivantes par rapport aux cellules MP.

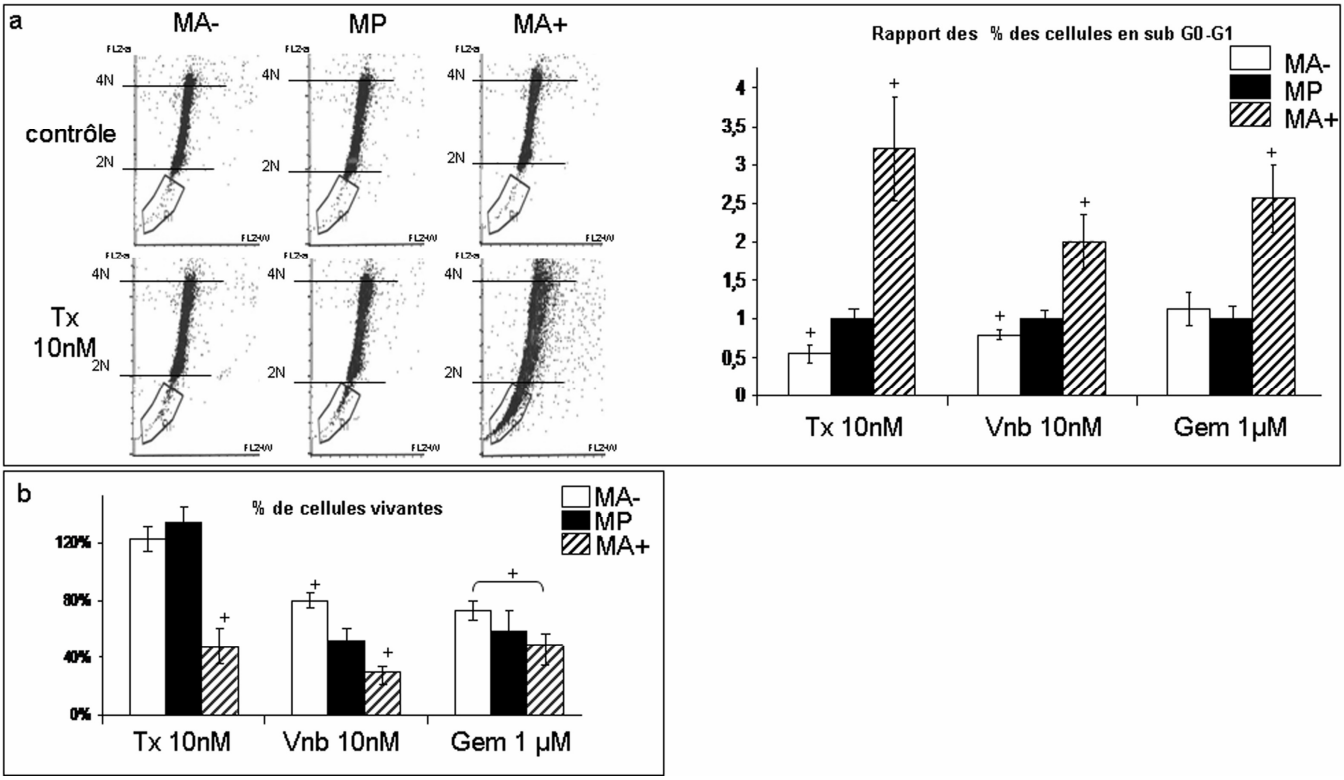


Figure 26: Evaluation de la mort cellulaire et de l'apoptose dans les cellules MA-, MP et MA+ incubées avec différents agents antitumoraux. a : Distributions des cellules en phase sub G0-G1 évaluées par cytométrie de flux sur des cellules non exposées (control) et après exposition à 10nM de taxol (Tx) ou vinorelbine (Vnb) ou à 1µM de gemcitabine (Gem) (gauche : graphes représentatifs, droite : moyennes des pourcentages des cellules en phase sub G0-G1). b : Evaluation, par microscopie après marquage de l'ADN au DAPI, du pourcentage des cellules vivantes adhérentes en présence de 10nM de taxol (Tx) ou de 10nM de vinorelbine (Vnb) ou de 1µM de gemcitabine (Gem) par rapport aux conditions basales (cellules non exposées). Les barres représentent les déviations standards. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

Nous avons ensuite mesuré la population de cellules apoptotiques par marquage de l'Annexine V et analyse en microscopie à fluorescence (figure 27). Les cellules non exposées présentaient moins de 1% de cellules positives à l'Annexine V pour les 3 lignées cellulaires. Après incubation avec le taxol, les cellules MA- avaient un index apoptotique significativement ($p<0,05$) plus faible (1%) que les cellules MP (3%) alors que les cellules MA+ présentaient un index apoptotique significativement ($p<0,05$) plus élevé (7%). Des résultats similaires ont été obtenus avec la vinorelbine et la gemcitabine (données non représentées).

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une augmentation du contenu en Arl2 induirait une chimiosensibilité aux agents antitumoraux alors qu'une diminution du niveau d'expression d'Arl2 serait associée à une résistance à ces différents agents chimiothérapeutiques.

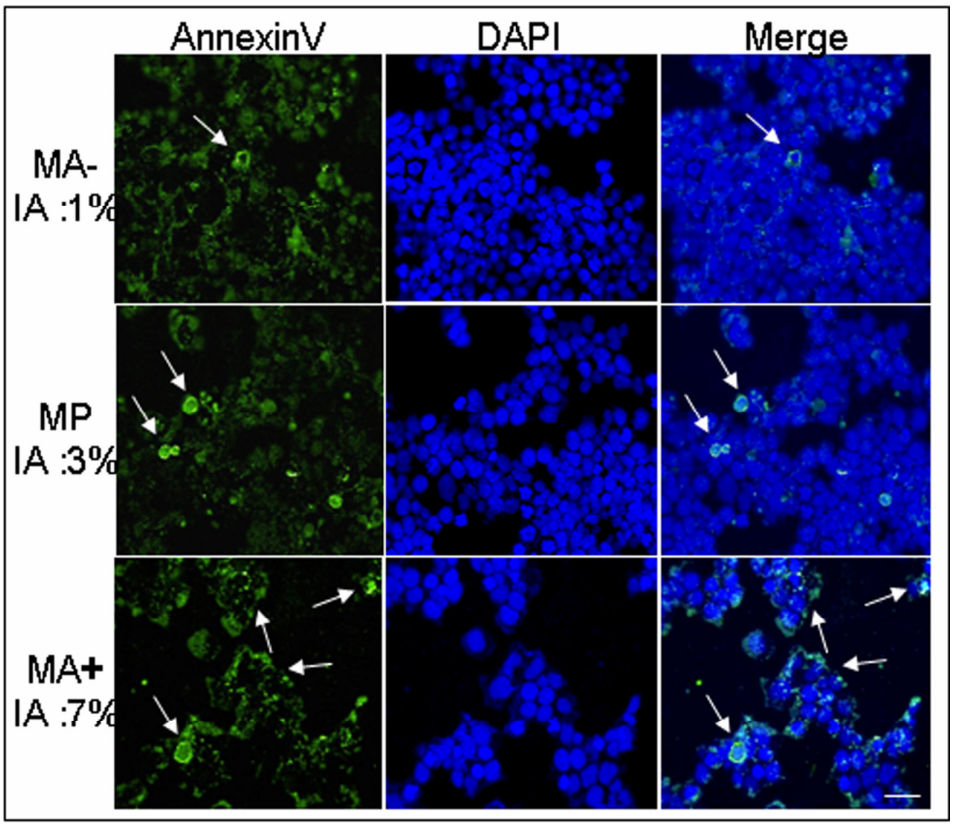


Figure 27 : Images représentatives de chaque lignée cellulaire exposées à 10nM de taxol après marquage de l'Annexine V (vert) et de l'ADN (DAPI, bleu). Les moyennes des indices apoptotiques (IA) ont été évaluées par microscopie confocale sur 300 cellules appartenant à au moins 3 images différentes. Les barres d'échelles représentent 20µm. Les flèches blanches marquent les cellules positives à l'Annexine V. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

6.2.2. Le contenu en Arl2 n'influence pas l'arrêt en G2/M induit par les agents anti-microtubulaires

Nous avons évalué l'arrêt des cellules en G2/M après incubation avec 10nM de taxol ou de vinorelbine (figure 28). Comme nous l'avons précédemment décrit, les cellules non exposées MA- possédaient une fraction de cellules en G2/M significativement plus petite que les cellules MP et MA+. Par conséquent, nous avons présenté les résultats sous la forme de pourcentages bruts et non sous forme de valeurs rapportées sur les conditions non exposées. Dans ces conditions, aucune différence significative du pourcentage de cellules en G2/M après les traitements anti-microtubules n'a été observée.

De ce fait, les différences de sensibilité aux agents anti-microtubule précédemment observées ne semblent pas être dues à une différence d'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M de nos lignées cellulaires.

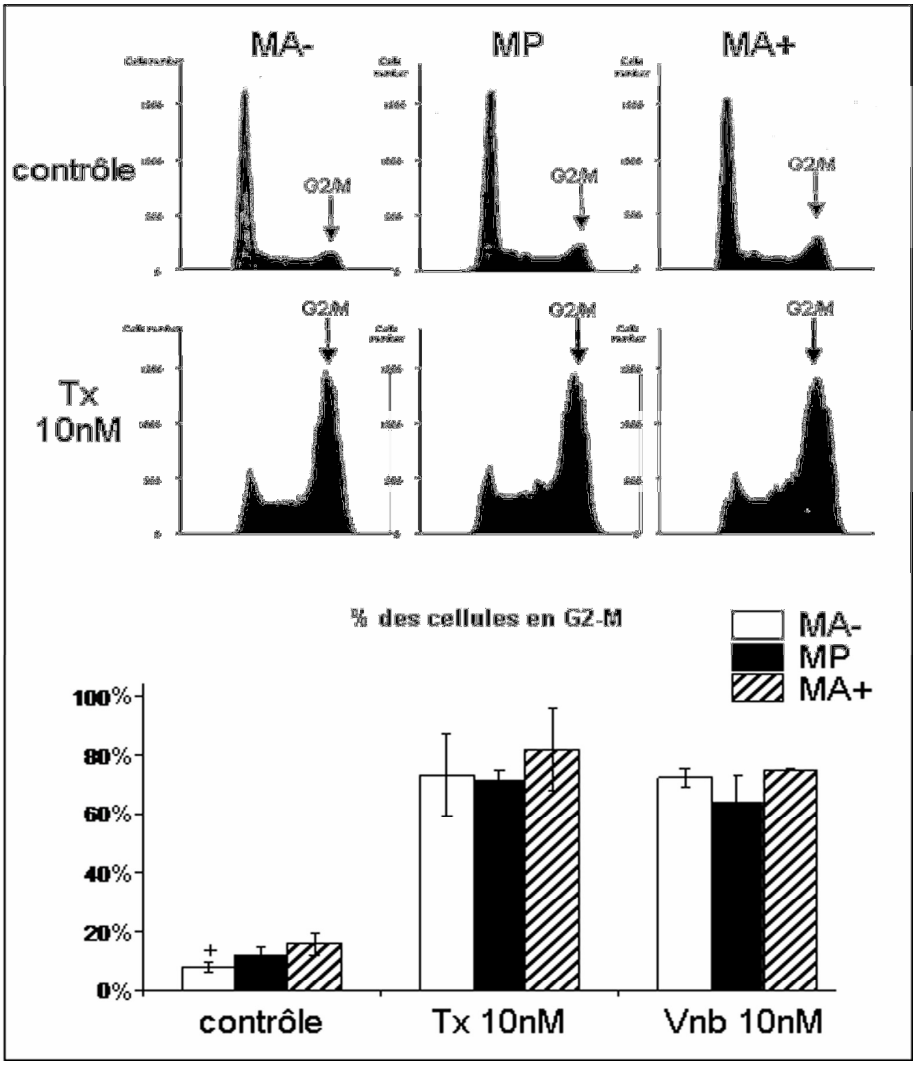


Figure 28: Arrêt en phase G2/M des cellules MA-, MP et MA+ après exposition aux agents antimicrotubules. Distributions des cellules en phase G2/M évaluées par cytométrie de flux sur des cellules non exposées (contrôle) ou après incubation avec 10nM de taxol (Tx) ou 10 nM de vinorelbine (Vnb) (gauche : graphes représentatifs des distributions en cycle, droite : moyennes des pourcentages des cellules en G2/M). Les barres représentent les déviations standards. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

6.2.3. La localisation nucléaire et l'activité de p53 après exposition à différents agents chimiothérapeutiques sont différentes selon le niveau d'Arl2

Il a été montré, dans des études antérieures, que l'arrêt de la prolifération cellulaire induite par le paclitaxel et le nocodazole est dépendant de la voie p53/p21(Giannakakou *et al.*, 2001, Lanni *et al.*, 1998) et notre équipe a également trouvé la présence de mutation de p21 dans des modèles de cellules résistantes au paclitaxel (Galmarini *et al.*, 2006). Nous avons alors analysé la localisation de p53 dans nos modèles par microscopie confocale (figure 29). Après exposition des cellules à 1µM de gemcitabine, les cellules MA- possédaient 2 fois moins de noyaux p53-positifs par rapport aux cellules MP exposées ($p<0.05$). Des résultats similaires ont été obtenus après exposition des cellules à la vinorelbine. De plus, après exposition à la vinorelbine, les cellules MA+ présentaient un pourcentage significativement plus élevé de noyaux p53-positifs (X1.8, $p<0.05$). Il faut noter qu'à l'état basal, les 3 lignées cellulaires MA-, MP et MA+ possédaient un taux très bas et similaire de noyaux p53-positifs (<2%) (figure 29a).

Ces données suggèrent que le contenu en Arl2 influence la capacité du facteur de transcription p53 à être transloqué dans le noyau après exposition à des agents chimiothérapeutiques.

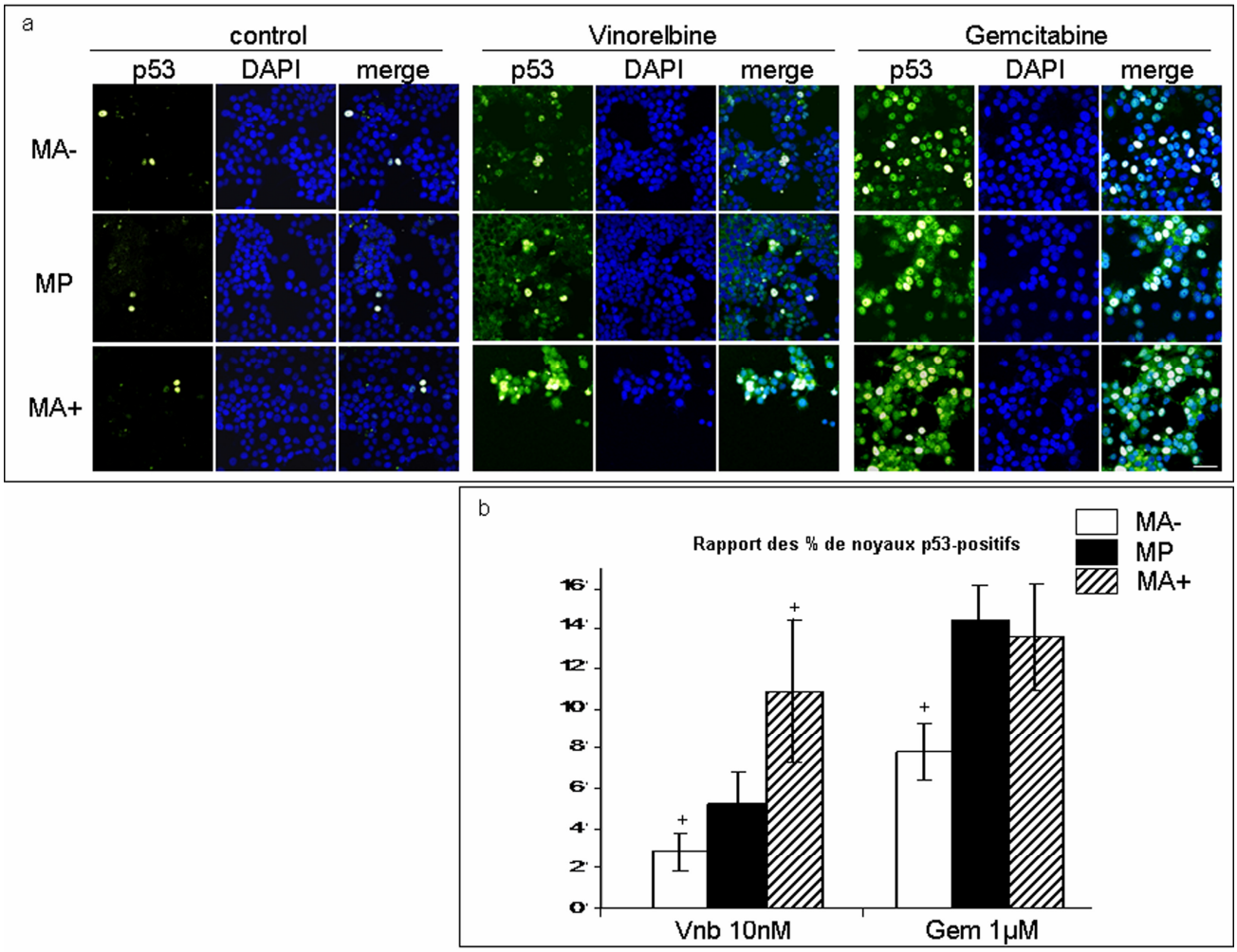


Figure 29: Marquage p53 des cellules MA-, MP et MA+ après incubation avec différents composés antitumoraux. a : : Images représentatives de chaque lignée cellulaire non exposée (control) ou exposée à 1µM gemcitabine (Gem) ou à 10nM de vinorelbine (Vnb) après marquage de p53 (anticorps DO7 (jaune/vert)) et de l'ADN (DAPI, bleu). b : moyennes des rapports des pourcentages de noyau p53-positifs évaluées par microscopie confocale sur les cellules contrôles. Les barres d'échelles représentent 30µm. Les barres représentent les déviations standards. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

Nous avons également étudié, par RT-PCR quantitative en temps réel après exposition à la gemcitabine, l'expression de différents gènes connus pour être des cibles transcriptionnelles de p53 (figure 30a). Une des cibles majeures de p53 impliquée dans l'arrêt des cellules en G0-G1 est p21/Waf1, un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes (Choisy-Rossi *et al.*, 1998). PIG3 (p53-induced gene 3) est impliqué dans l'induction de l'apoptose (el-Deiry, 1998). PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) a également été identifié comme protéine pro-apoptotique activée par p53 et faisant partie de la famille Bcl-2 (voie d'induction mitochondriale) (Yu *et al.*, 2003). Après exposition à la gemcitabine, les cellules MA+ présentaient une plus forte augmentation de l'expression des ARNm codant pour p21 et PUMA par rapport aux cellules MP ($p<0.05$, +30%). Ces cellules possédaient également une augmentation plus importante de l'ARNm de PIG3 par rapport aux cellules MA- ($p<0.05$, +70%). Les cellules MA- avaient une augmentation plus faible de l'ARNm de p21 après exposition à la gemcitabine par rapport aux cellules MP ($p<0.05$, -40%). Des résultats similaires ont été obtenus après traitement avec des agents anti-microtubulaires.

Au niveau protéique (figure 30b), après exposition des cellules à 1 µM de gemcitabine, les cellules MA- possèdaient 1.8 fois moins et les cellules MA+ 1.2 fois plus de noyaux p21-positifs que les cellules MP exposées ($p<0.05$). Aucun signal p21 n'était détectable dans les conditions basales pour les 3 lignées cellulaires. Des résultats similaires ont été obtenus après traitement avec des agents anti-microtubulaires.

Par conséquent, le niveau d'expression d'Arl2 semble influencer la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle pro-apoptotique de p53 après exposition à différents agents antitumoraux.

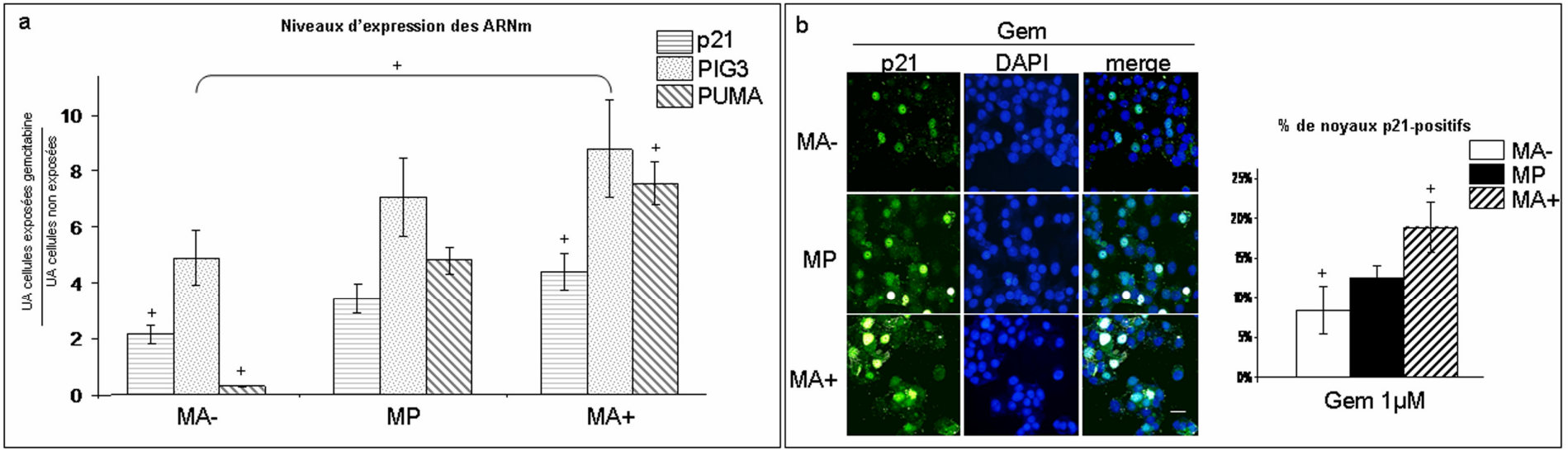


Figure 30: Evaluation de l'activité transcriptionnelle de p53 après exposition à la gemcitabine des cellules MA-, MP et MA+. a : moyennes des niveaux d'expression des ARNm codant pour p21/waf1 (p21), PIG3 et PUMA dans les cellules MA-, MP et MA+ exposées à la gemcitabine, déterminés par RT-PCR quantitative en temps réel, exprimées en unité arbitraire (UA), et rapportés sur les cellules correspondantes non-exposées. b : images représentatives pour chaque lignée cellulaire exposée à 1µM de gemcitabine (Gem) après marquage de p21 (jaune/vert) et de l'ADN (DAPI, bleu) et moyennes des pourcentages de noyaux p21-positifs évaluées par microscopie confocale. Les barres d'échelles représentent 10µm. Les barres représentent les déviations standards. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

6.2.4. L'expression d'Arl2 influence la distribution et la phosphorylation de p53

Nous avons étudié la distribution et la phosphorylation de p53 dans les conditions basales au niveau des fractions purifiées de microtubules et de protéines solubles (figure 31). Les révélations des immunoblots en utilisant un anticorps anti-p53 (clone DO7) ont montré une différence dans la distribution des formes de p53 dans ces fractions (figure 31a). Dans les 3 lignées cellulaires MA-, MP et MA+, les fractions microtubulaires apparaissaient enrichies avec la bande la plus lourde de p53 (masse moléculaire apparente de 60kDa) qui était faiblement présente dans la fraction de protéines solubles. Cette forme est similaire en taille à une forme de p53 obtenue après incubation des cellules MP pendant 24 heures avec 150 nM de doxorubicine (Adriblastine®; Pharmacia & Upjohn, France), composé connu pour induire une phosphorylation de p53. A l'inverse, la bande observée la plus légère de p53 (masse moléculaire de 53kDa) était faiblement présente dans les fractions microtubulaires et la plus prédominante dans les fractions protéiques solubles. De plus, les cellules MA- possédaient un contenu plus important de la forme à 60kDa de p53 dans les fractions microtubulaires par rapport aux cellules MP et MA+. L'expression totale de p53 et sa localisation à l'état de base déterminée par immucytofluorescence (figure 31b) étaient similaires pour les 3 lignées cellulaires.

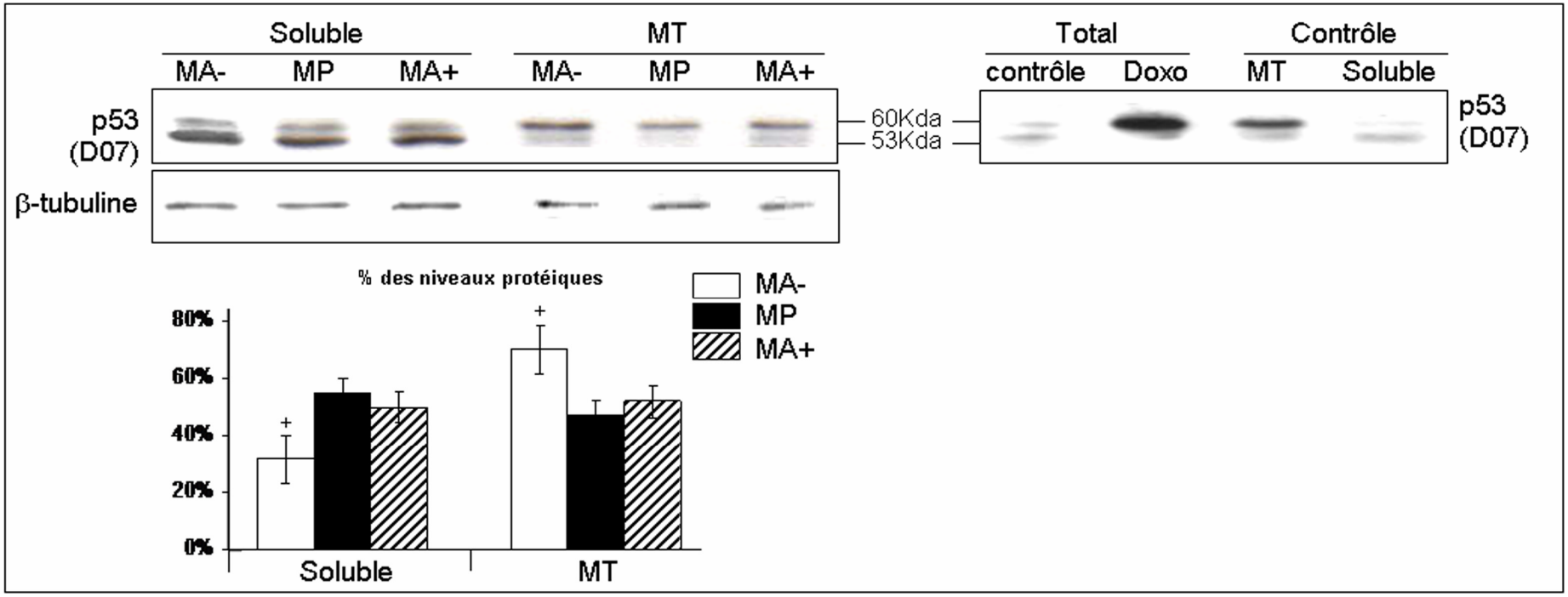


Figure 31 : Profils d'expression de p53 dans les fractions microtubulaires des cellules MA-, MP et MA+. Gauche : Western Blot représentatifs des profils de p53 et de β-tubuline dans les fractions de protéines solubles et microtubulaires (MT) et moyennes des niveaux d'expressions de p53. Droite : Western Blot représentatifs du profil d'expression de p53 dans les extractions totales à partir de cellules MP non exposées (contrôle) et exposées à 150nM de doxorubicine (Doxo) et dans les fractions solubles et microtubulaires des cellules MP non exposées.

Afin de déterminer quelles formes de p53 phosphorylées seraient préférentiellement liées aux microtubules, nous avons testé différents anticorps monoclonaux spécifiques de ces différentes formes. Nous avons trouvé que la forme phospho-ser15-p53 était la seule forme de p53 détectée uniquement dans les fractions microtubulaires et présentant des expressions différentielles selon les lignées cellulaires. La phospho-ser15-p53 apparaissait dans la fraction microtubulaire avec une masse moléculaire apparente de 60 kDa et n'était pas détectable dans les fractions solubles (figure 32a). Dans les fractions microtubulaires et dans les extractions de protéines totales des cellules MA-, cette forme est significativement augmentée (+100%, $p<0.05$) par rapport aux cellules MP et MA+. Pour déterminer si cette différence était également observable au sein des cellules entières, nous avons procédé à l'analyse par immunocytofluorescence en utilisant le même anticorps spécifique anti-phospho-ser15-p53 et avons observé une localisation centrosomale de phospho-ser15-p53 (figure 32b) dans les cellules mitotiques des 3 lignées cellulaires, en accord avec des études précédentes (Morris *et al.*, 2000, Tritarelli *et al.*, 2004). Aucun marquage n'a pu être détecté dans les cellules MA-, MP et MA+ interphasiques.

Ces résultats suggèrent que l'expression de la protéine Arl2 influencerait le statut de phosphorylation de p53 notamment au niveau de la sérine 15 qui, lorsqu'elle est phosphorylée, se lierait préférentiellement aux microtubules.

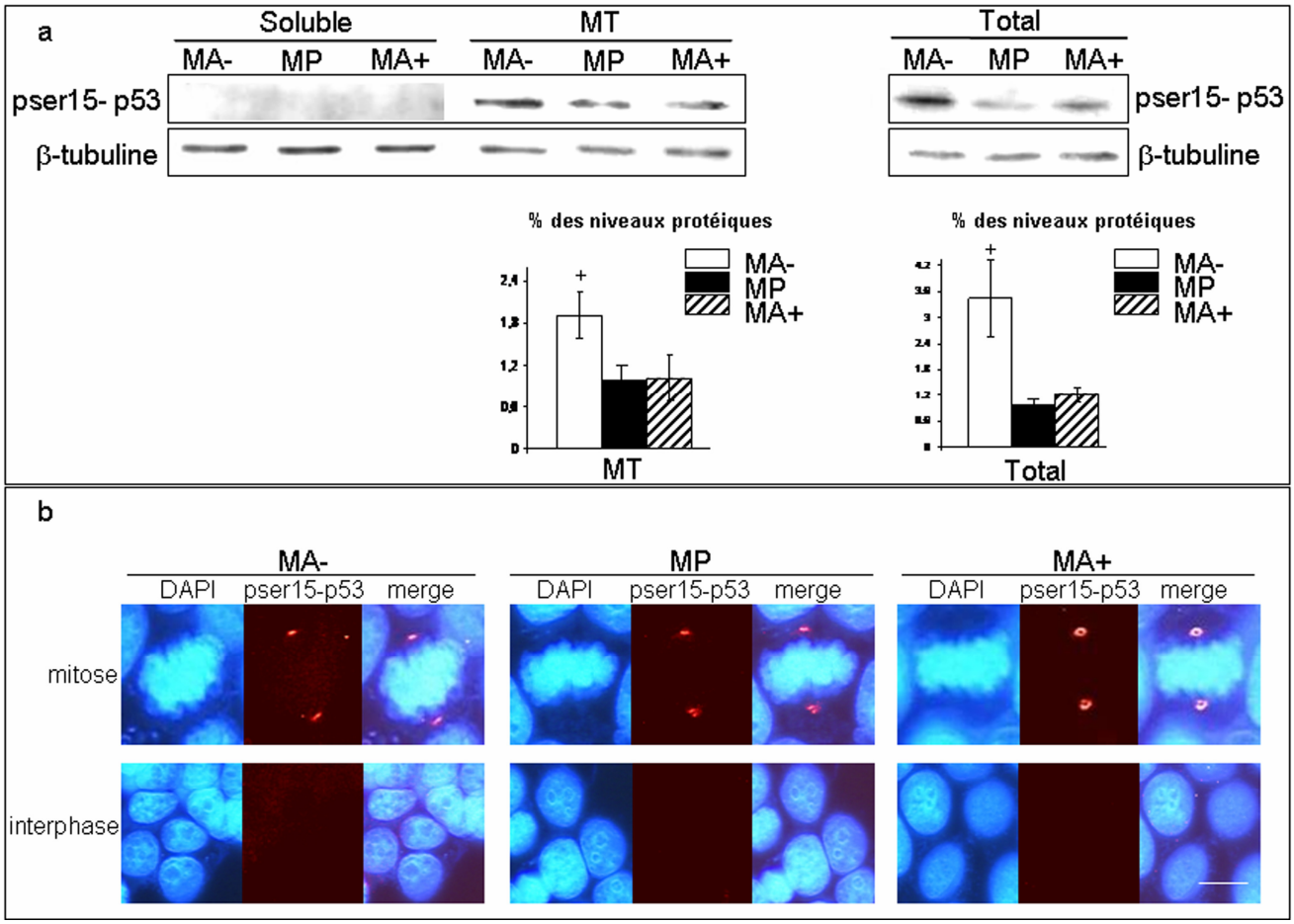


Figure 32 : Distribution et localisation de phospho-ser15-p53 dans les cellules MA-, MP et MA+. a : Western-Blot représentatifs des niveaux d'expression de phospho-ser15-p53 (pser15-p53) et de la β-tubuline dans les fractions protéiques solubles et microtubulaires (MT) et dans les extractions totales et moyennes des niveaux d'expression de phospho-ser15-p53. b : Images représentatives de chaque lignée cellulaire après marquage de phospho-ser15-p53 (rouge) et de l'ADN (DAPI, bleu) selon les phases du cycle. Les barres d'échelles représentent 10µm pour les images des cellules interphasiques et 5 µm pour les cellules mitotiques. Les barres représentent les déviations standards. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

6.2.5. PP2A est impliquée dans la phosphorylation et dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques

Pour déterminer si les différences précédemment décrites du contenu en PP2A dans nos modèles pourraient expliquer le statut différentiel de la phosphorylation de p53, les cellules MP ont été incubées avec 10nM d'acide okadaïque, concentration connue pour inhiber sélectivement PP2A dans les cellules MCF7 (Bialojan *et al.*, 1988, Messner *et al.*, 2006). Après 24 heures d'incubation, nous avons observé une augmentation spécifique et significative de la forme phospho-p53 dans les fractions de protéines solubles (X3, $p<0.05$) et une augmentation encore plus marquée dans les fractions microtubulaires (X7, $p<0.05$) (figure 33a).

Afin d'établir un lien entre PP2A et la sensibilité aux agents tumoraux dans nos lignées cellulaires, nous avons préincubé les cellules MP avec 10nM d'acide okadaïque pendant 2 heures avant d'effectuer un test de cytotoxicité avec le taxol et la vinorelbine (figure 33b). La préincubation des cellules à l'acide okadaïque a induit une augmentation significative des valeurs des IC50 pour le taxol et la vinorelbine (respectivement X2.6 et X50, $p<0.05$) par rapport aux cellules n'ayant pas été préincubées à l'acide okadaïque. Ces derniers résultats suggèrent l'implication de PP2A dans la phosphorylation et la localisation de p53 ainsi que dans la réponse différentielle aux traitements chimiothérapeutiques observés.

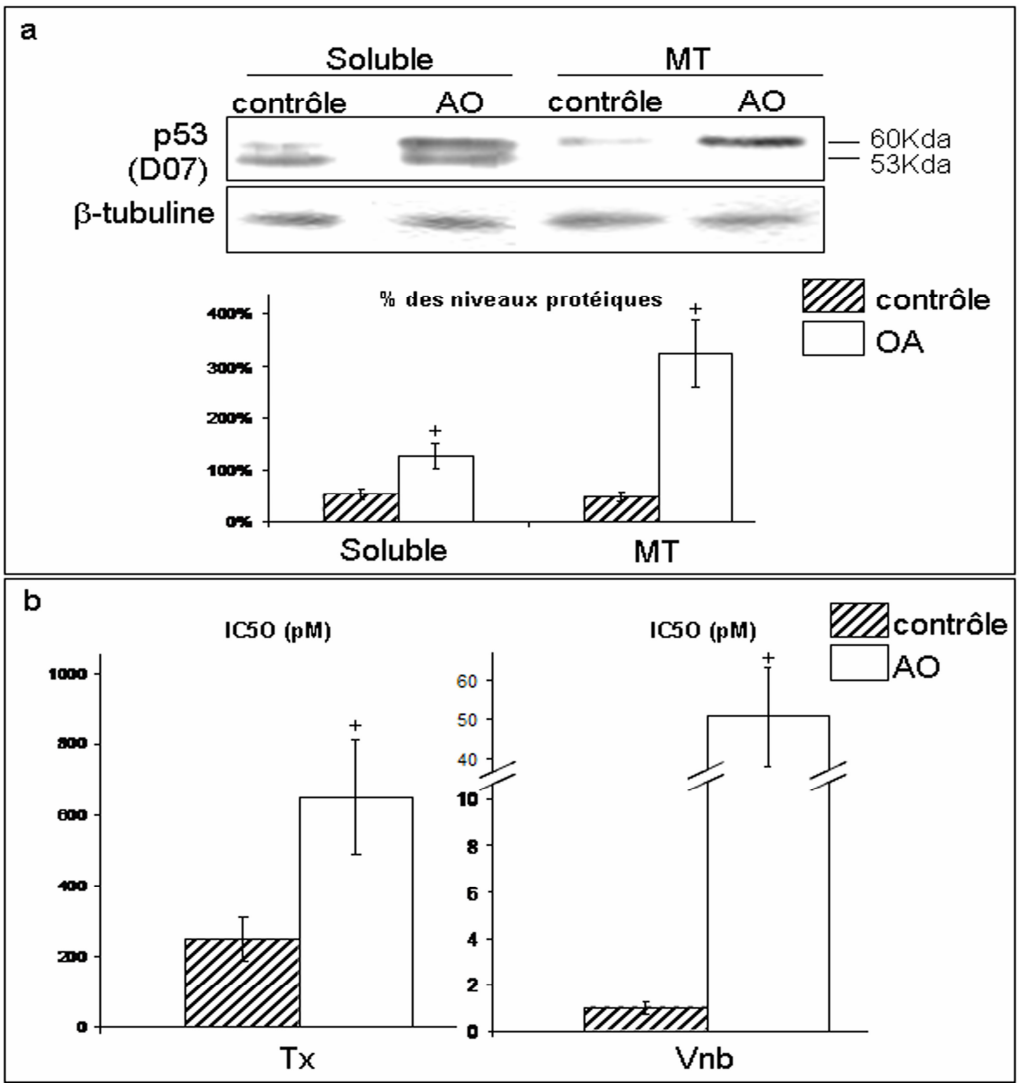


Figure 33 : Implication de PP2A dans la localisation cellulaire de p53 et le phénotype de résistance. a : Lower : Western Blot représentatif du profil p53 dans les extractions de protéines solubles et microtubulaires de cellules MP non exposées (contrôle) et exposées à 10nM d'acide okadaïque (AO) et moyennes de la distribution de p53 après incubation à l'acide okadaïque. b : Moyennes des IC50 pour le taxol (Tx) et pour la vinorelbine (Vnb) de cellules MP non préexposées (contrôle) et préexposées à l'acide okadaïque (AO). Les barres représentent les déviations standards. La signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées cellulaires).

6.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que des altérations du contenu en Arl2 étaient associées avec des différences dans la sensibilité aux agents antitumoraux des cellules dérivées de MCF7. Nos données suggèrent que des modifications de la localisation et de la phosphorylation de p53 sont impliquées dans ces différences de sensibilité par un mécanisme dépendant de PP2A.

Pour un certain nombre de tumeurs possédant une forme sauvage de p53, la perte d'activité de p53 est associée avec une localisation exclusivement cytoplasmique de ce facteur de transcription. Dans ce cas, p53 est exclu du noyau par séquestration cytoplasmique ou par transport hors du noyau hyperactif. De plus, il a été montré qu'un tel confinement cytoplasmique de p53 était corrélé avec une résistance plus importante à la radiothérapie et à la chimiothérapie constituant un facteur de mauvais pronostic indépendant dans les cancers (O'Brate *et al.*, 2003).

Nous avons choisi de procéder à l'analyse de la localisation de p53 après différents traitements antitumoraux en utilisant, dans un premier temps, un anticorps non spécifique d'une phosphorylation de p53 (clone DO7) comme il a été montré que la phosphorylation de p53 au niveau des sérines clés est non essentielle pour son activité transcriptionnelle et pro-apoptotique (Thompson *et al.*, 2004). Comme tests fonctionnels de l'activité transcriptionnel de p53, nous avons étudié l'expression de 3 gènes impliqués soit dans l'arrêt en G0-G1 (p21) soit dans l'induction de l'apoptose (PIG3 et PUMA). PUMA est, de plus, spécifique de la voie d'induction mitochondriale de l'apoptose. Sous incubation avec des agents chimiothérapeutiques, les cellules avec un niveau plus élevé d'Arl2 présentaient le pourcentage de noyaux p53-positifs le plus important et le niveau nucléaire de p53

dans ces cellules semblait atteindre plus facilement ou rapidement le niveau seuil pour induire la transcription de p21, PIG3 et PUMA que les cellules à plus faible niveau d'Arl2.

p53 est cible de plusieurs phosphatases telles que PP2A (Dohoney *et al.*, 2004) (Messner *et al.*, 2006) mais aussi PP1(Haneda *et al.*, 2004) et PP5 (Zuo *et al.*, 1998). Nous avons identifié une forme de phosphorylation an niveau de la sérine 15 de p53 comme pouvant être impliquée dans les phénotypes que nous avons observés. Néanmoins, des expériences complémentaires utilisant des formes mutées au niveau de la sérine 15 de p53 sont nécessaires pour déterminer précisément l'implication de phospho-ser15-p53 dans nos phénotypes de résistance. Nous avons mis en évidence que phospho-ser15-p53 était exclusivement détectable dans les fractions microtubulaires des cellules à l'état basal et que le niveau d'expression de cette forme était inversement corrélé avec le niveau d'expression d'Arl2. Cependant, la méthode de purification des microtubules ne permet pas de conserver des noyaux non lysés. De ce fait, nous avons effectué l'immunolocalisation de la phospho-ser15-p53 afin d'illustrer le fait que l'augmentation de cette forme observée dans les cellules MA- était bien spécifique de la fraction microtubulaire sans augmentation au niveau du noyau.

Dans le but de déterminer l'implication de PP2A dans l'état de phosphorylation de p53 au sein de nos modèles, nous avons utilisé l'acide okadaïque à une concentration décrite comme inhibant sélectivement cette phosphatase et nous avons observé, en accord avec les résultats de Messner et al. (Messner *et al.*, 2006), que PP2A influençait la phosphorylation de p53 et son association avec les microtubules. En effectuant une préincubation de cellules avec une même concentration d'acide okadaïque, nous avons induit une forte résistance

des cellules cancéreuses aux agents anti microtubules. Des études complémentaires doivent être effectuées afin de déterminer l'impact du complexe PP2A/Arl2 sur la phosphorylation de p53 et sur son affinité pour des microtubules purifiés. Ces données montrent la possibilité d'une liaison préférentielle de certaines formes phosphorylées de p53 aux microtubules conduisant à une séquestration des formes actives de p53 et inhibant ainsi son activité transcriptionnelle.

7. ETUDE DES MODIFICATIONS DU CONTENU EN ARL2 SUR LE DEVELOPPEMENT TUMORAL DES CELLULES DE CANCER DU SEIN

7.1. Introduction

Nous avons précédemment démontré que des altérations de l'expression de la protéine Arl2 influençaient l'expression, la localisation et l'activité de PP2A avec des conséquences fonctionnelles au niveau de certaines protéines cibles de PP2A. Comme PP2A a été décrite comme gène suppresseur de tumeur, nous avons suggéré qu'Arl2 pourrait avoir un rôle dans le développement tumoral de nos modèles. Dans cette partie, nous avons donc étudié les conséquences des modifications d'expression d'Arl2 sur le phénotype tumoral et la capacité d'infiltration des cellules. PP2A semblant être localisé de façon différentielle notamment au niveau des nucléoles des cellules, nous avons également cherché à établir un lien entre morphologie nucléolaire, ribogénèse et développement tumoral.

7.2. Résultats

7.2.1. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la polarité cellulaire et la morphologie nucléolaire

La morphologie cellulaire a été étudiée par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti β-tubuline-FITC et une contrecoloration de l'ADN au DAPI (figure 34). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un anticorps anti α-tubuline ou anti β-actine.

Comme nous l'avons précédemment décrit pour les cellules MA-, MP et MA+, les cellules MDAA+ occupaient 30 à 40 % de surface en plus et les cellules MDAA- 25 à 30% de surface en moins que les cellules MDAP ($p<0.05$).

De plus, les cellules MDAA- avaient une augmentation de la circularité cellulaire ($p<0.05$, +50%) par rapport aux cellules MDAP. Des résultats similaires en termes de circularité ont été observés pour les cellules MA-, MP et MA+.

Le niveau d'expression de la protéine Arl2 est corrélé avec l'aire et la circulairé/polarité de cellules de cancer du sein. Il est admis qu'une cellule normale est hautement polarisée, caractérisé par la distribution asymétrique du noyau et du cytosquelette. Une cellule tumorale présente une morphologie circulaire sans polarisation cellulaire. Ces critères architecturaux sont utilisés au moment du diagnostic dans la classification des tumeurs.

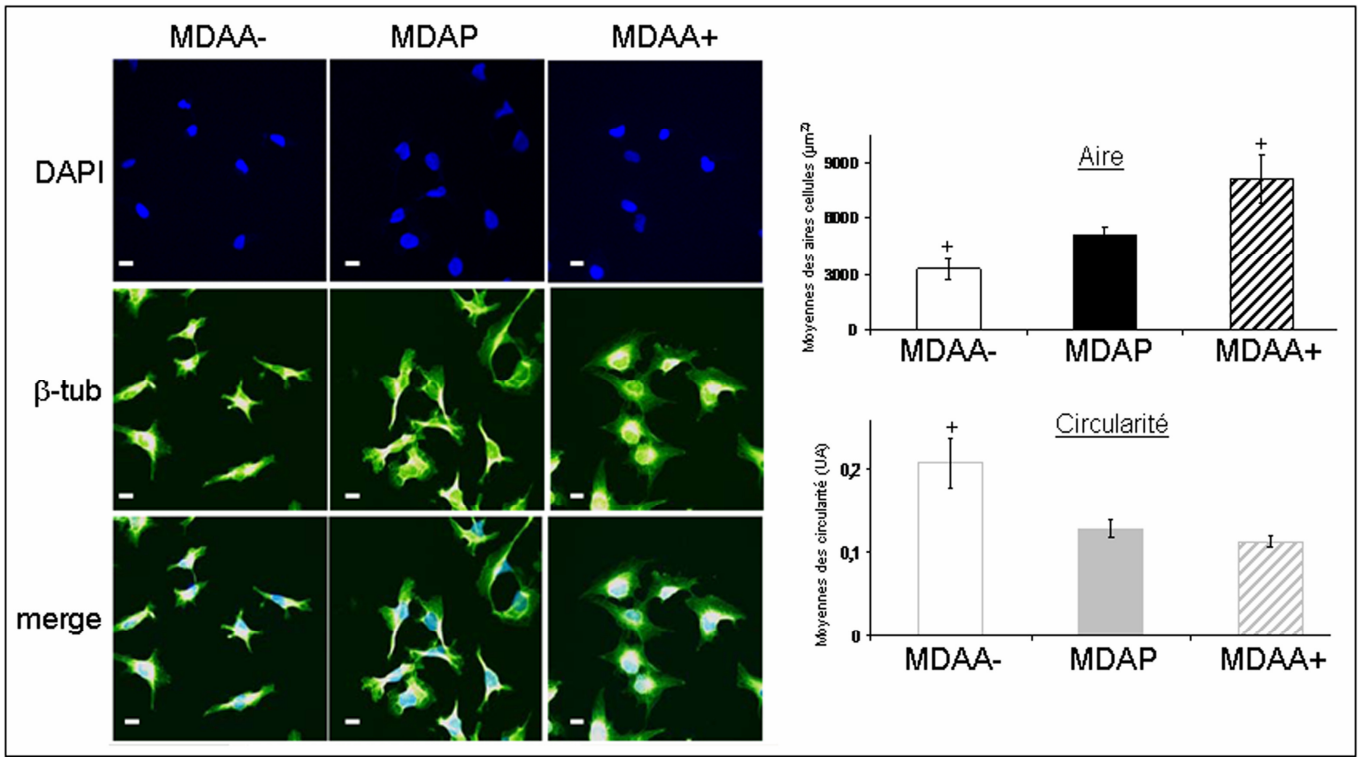


Figure 34 : Analyses morphologiques des modèles cellulaires MDAA-, MDAP et MDAA+. Images représentatives des cellules MDAA-, MDAP et MDAA+ après marquage de l'ADN au DAPI (bleu), de la β-tubuline (β-tub, vert) et moyennes des aires (μm^2) et de la circularité ces cellules évaluées par microscopie confocale pour au moins 200 cellules sur au moins 3 images différentes. Une circularité égale à 1 correspond à un cercle parfait alors qu'une circularité proche de 0 correspond à une forme polygonale étirée. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

Les statuts morphologiques nucléaire et nucléolaire sont également utilisés dans l'établissement du grade tumoral. Nous avons observé par microscopie et après marquage de l'ADN au DAPI que les cellules MA- possédaient des nucléoles proéminents dont certains sont très réfractaires à la pénétration du DAPI (figure 35a). Après traitement des cellules avec une concentration d'acide okadaïque inhibant spécifiquement PP2A, nous avons observé que les nucléoles des cellules MA+ devenaient réfractaires au marquage par le DAPI. Par des analyses en microscopie électronique (figure 35b), nous avons observé que les nucléoles des cellules MA- possédaient plus de centres fibrillaires par nucléole que les cellules MP alors que les nucléoles des cellules MA+ ne présentaient qu'un ou 2 centres fibrillaires par nucléole. Des analyses complémentaires sont en cours pour étudier l'activité nucléolaire et ribogénique de nos modèles en collaboration avec l'équipe du Dr. JJ Diaz (Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR 5534, Lyon). Cette équipe a déjà obtenu un certain nombre de résultats montrant notamment une modification importante du niveau d'expression de certaines protéines nucléolaires et de la synthèse des ARN ribosomiques au sein des lignées MA-, MP et MA+.

Comme nous l'avons précédemment décrit, la proéminence des nucléoles ainsi que l'absence de polarisation cellulaire sont des éléments associés à un grade tumoral plus élevé.

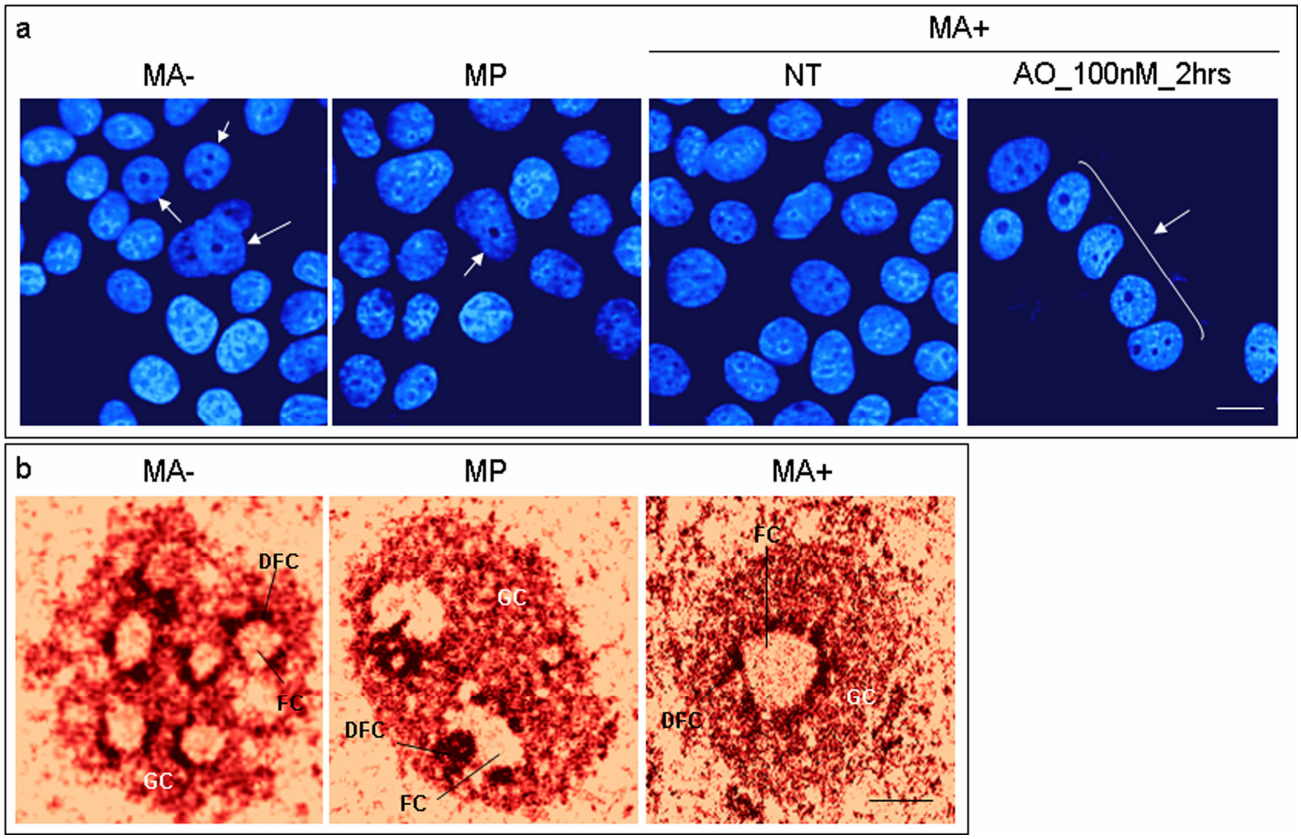


Figure 35 : Analyses des morphologies nucléolaires des cellules MA-, MP et MA+. a : images représentatives des cellules après marquage de l'ADN au DAPI (bleu) obtenues par microscopie confocale sur les cellules MA-, MP et MA+ à l'état basal et sur les cellules MA+ incubées avec 100nM d'acide okadaïque pendant 2 heures. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm. Les flèches blanches marquent les nucléoles réfractaires au marquage par le DAPI. b : images représentatives des nucéloles des cellules obtenues par microscopie électronique. FC : centres fibrillaires ; DFC : composés denses fibrillaires ; GC : composés granulaires. Les barres d'échelle correspondent à 1 µm.

7.2.2. L'inhibition de contact de cellules cancéreuses est corrélée avec le contenu en Arl2

Nous avons étudié la distribution de cellules au niveau de leur répartition au niveau de la surface d'adhésion par microscopie à contraste de phase et par incubation de MTT (figure 36). Les cellules MA- présentaient une surface d'occupation hétérogène avec des espaces inoccupés et des régions à haute densité cellulaire. Pour un nombre de cellules proliférantes comparables (mesuré par la DO des cristaux de formazan), les cellules MP, et d'autant plus les cellules MA+, occupaient plus de surface disponible avec une meilleure homogénéité d'occupation. La microscopie en contraste de phase a révélé que les cellules MA- prolifèraient sous forme de multi-couches alors que les cellules MA+ se multipliaient exclusivement en monocouche. Les cellules MP avaient une distribution cellulaire intermédiaire entre les cellules MA- et MA+ (figure 36).

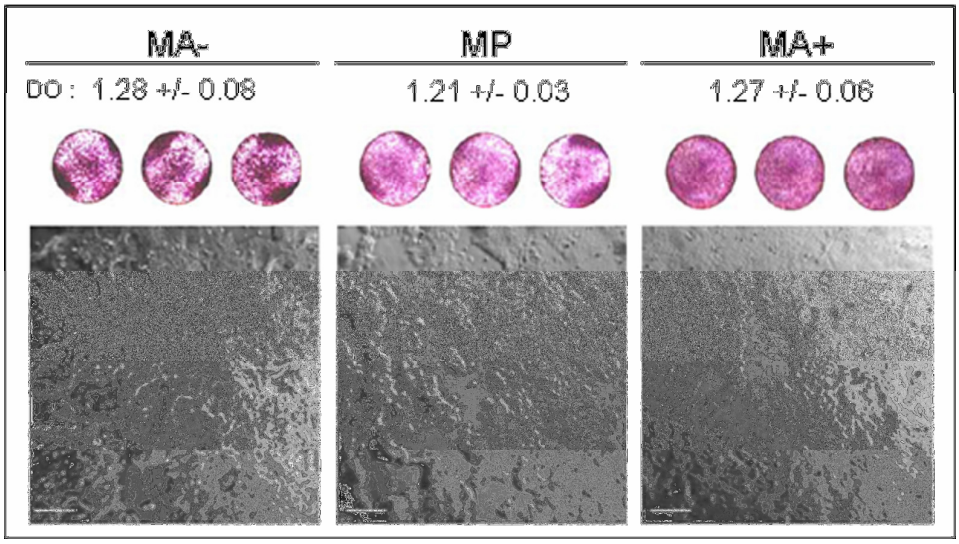


Figure 36: Distribution spatiale des cellules MA-, MP et MA+. Images représentatives de chaque lignée après marquage au MTT (en haut) et en microscopie à contraste de phase (en bas) pour des valeurs de densité optique des cristaux de formazan solubilisés données (DO). Les barres d'échelle correspondent à 100 µm.

Afin d'établir si Arl2 agissait spécifiquement sur les capacités d'inhibition de contact des cellules, nous avons ajusté les concentrations cellulaires en tenant compte des différences morphologiques observées. Les cellules les plus étalées (MA+ et MDAA+) ont été ensemencées à une concentration 30% inférieure et les cellules les moins étalées (MA- et MDAA-) à une concentration 30% supérieure que les cellules contrôles (respectivement MP et MDAP). Nous avons mesuré les vitesses de proliférations cellulaires à confluence par des tests au MTT et analyse en cytométrie de flux (figure 37a et 37b). A confluence, la vitesse de prolifération des cellules MA- était significativement plus élevée ($p<0.05$, +30%) par rapport à celle des cellules MP qui apparaît comme étant nulle après 5 jours d'ensemencement. La prolifération des cellules MA+ à confluence était significativement diminuée par rapport aux 2 autres lignées ($p<0.05$, -30%). Par cytométrie de flux (figure 37b), le rapport des cellules en phase G0-G1 pour la condition de cellules à confluence sur les cellules en phase G0-G1 pour la condition de cellules en phase exponentielle de croissance est significativement augmenté pour les cellules MA+ ($p<0.05$, +15%) et diminué pour les cellules MA- ($p<0.05$, -20%) par rapport aux cellules MP. A l'inverse, le rapport des cellules en phase S+G2-M pour la condition de cellules à confluence sur les cellules en phase S+G2-M pour la condition de cellules en phase exponentielle de croissance est significativement diminué pour les cellules MA+ ($p<0.05$, -14%) et augmenté pour les cellules MA- ($p<0.05$, +22%) par rapport aux cellules MP. Des résultats similaires ont été observés pour les modèles MDAA-, MDAP et MDAA+ (données non représentées).

Ces résultats ont montré que, lors de la confluence, les cellules avec un haut niveau d'Arl2 présentaient un arrêt important en phase G0-G1 corrélé avec une diminution du pouvoir de prolifération et que les cellules à faible niveau d'Arl2 ne

semblaient pas subir d'arrêt en phase G0-G1 au moment de la confluence et conservaient une activité proliférative.

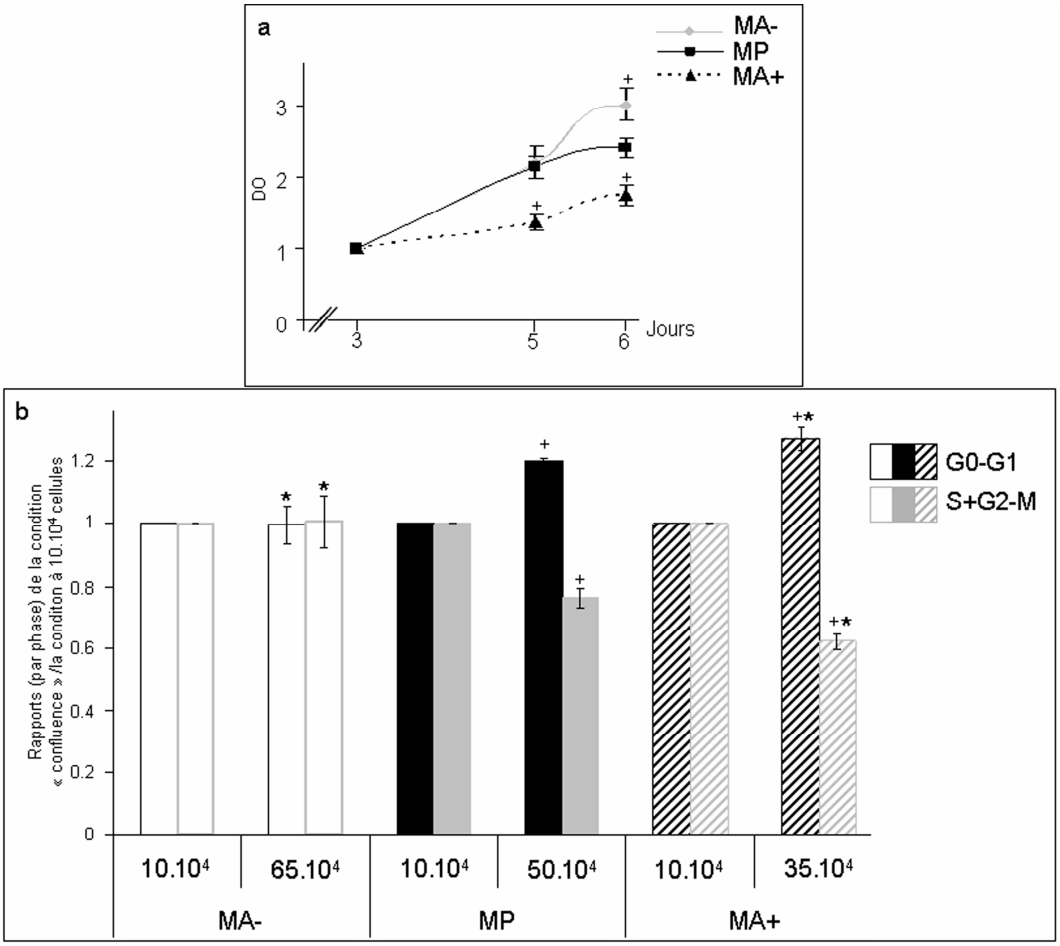


Figure 37: Analyses de l'inhibition de contact des cellules MA-, MP et MA+. a : moyennes des vitesses de prolifération évaluées à confluence par le test MTT et exprimée en unité de densité optique (DO) par jour. b : Evaluation, par cytométrie de flux, du rapport des phases G0-G1 et S+G2-M des cellules à confluence sur les cellules en phase exponentielle de croissance (condition à 10.10^4 cellules par puits). Les conditions 65.10^4, 50.10^4 et 35.10^4 cellules par puits correspondent aux conditions de confluence respectivement des cellules MA-, MP et MA+. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (* : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées, + : $p<0,05$ entre la condition à confluence et la condition en phase exponentielle de croissance pour chaque lignée).

7.2.3. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la croissance tridimensionnelle *in vitro* et le développement tumoral *in vivo*

Les cellules MA-, MP et MA+ ont été ensemencées en agar-mou et en agar-mou complété de 30% de matrigel (figure 38a). Aucune différence significative entre les cellules n'a été observé en croissance en agar-mou seul (croissance sans ancrage). Cependant, en agar-mou+30% de matrigel, les cellules MA+ développaient moins de colonies et de taille plus petite que les cellules MP alors que les cellules MA- développaient un nombre plus élevé de colonies cellulaires de taille significativement plus grande ($p<0.05$, +50%) que les cellules MP . Ceci suggère que les cellules à faible niveau d'Arl2 ont une capacité de croissance tridimensionnelle plus importante et dépendante de l'ancrage des cellules.

Les cellules MA-, MP et MA+ ont été ensemencées sur un tapis de matrigel pur (figure 38b). Entre le 6ème jour et le 13ème jour de croissance après ensemencement, nous avons observé que les 3 lignées cellulaires avaient une croissance tridimensionnelle comparable. Après 15 jours, les colonies des cellules MA+ commençaient à se désagréger. Après 19 jours, les colonies des cellules MP commençaient également à se désagréger alors que les colonies des cellules MA- restaient compactes. L'ensemble des cellules dérivées des MDA-MB-231 ne forment pas de colonies en matrigel mais se développent sous forme de toile cellulaire.

L'ensemble de ces résultats ont démontré que les cellules MA- avaient un pouvoir clonogénique augmenté et les cellules MA+ un pouvoir clonogénique diminué par rapport aux cellules MP. Ceci constitue également une caractéristique de l'agressivité tumorale.

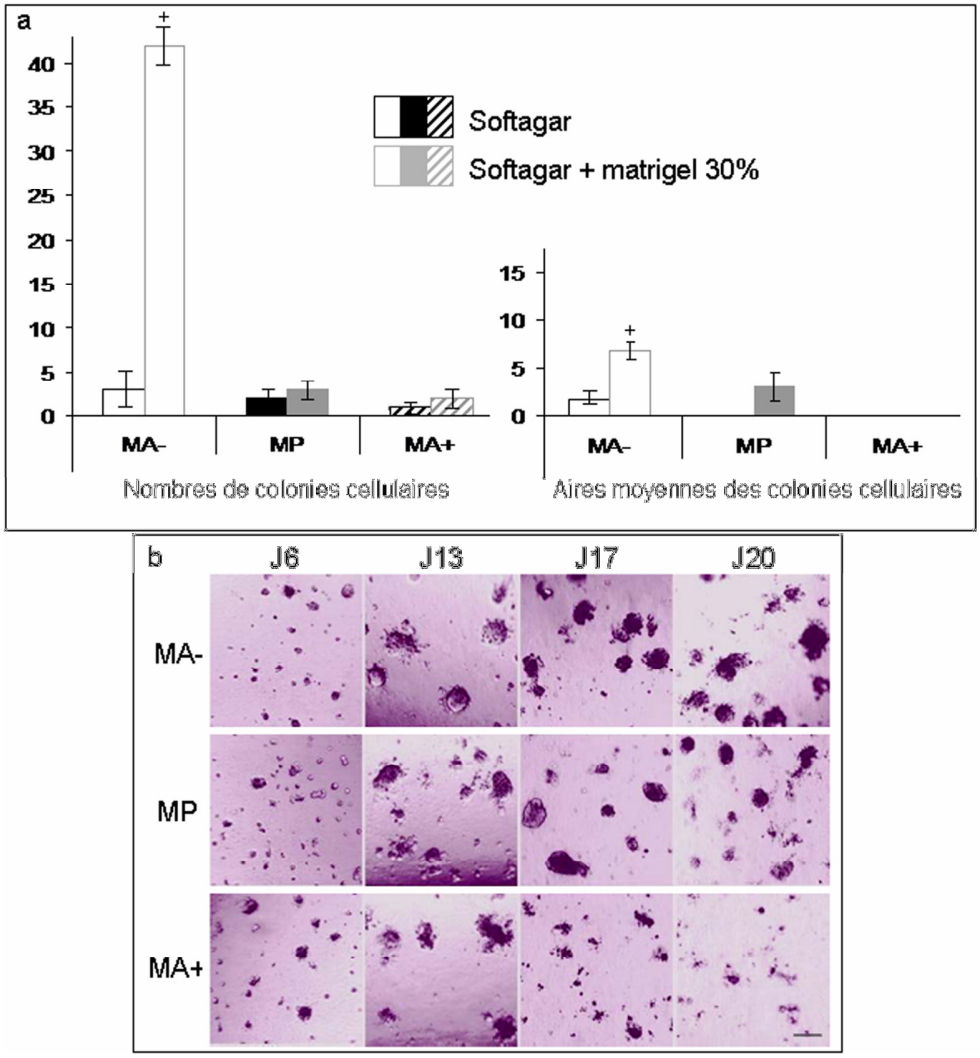


Figure 38 : Croissance tridimensionnelle *in vitro* des cellules MA-, MP et MA+. a : Evaluation du nombre et de l'aire moyenne (unité arbitraire) des colonies cellulaires en agar-mou et en agar-mou complété de 30% de matrigel. b : Images représentatives de l'évolution de la croissance tridimensionnelle au cours du temps (en jours) des colonies cellulaires en gel de matrigel pur. Les barres d'échelle correspondent à 200 µm. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* suggérant une capacité de développement tumoral modifiée selon le statut d'Arl2, nous avons procédé à l'injection de cellules au niveau de la graisse mammaire de souris immunodéprimées (figure 39). Les cellules dérivées des MDA-MB-231 ont été transfectées avec un gène codant pour la luciférase afin de procéder à leur visualisation en temps réel *in vivo.* Des le 17ème jour après l'injection intramammaire, les tumeurs développées par les cellules MDAA-luc formaient des tumeurs significativement plus importantes que les tumeurs des cellules MDAPluc ($p<0.05$, X2). Cette différence a été observée jusqu'à la fin du protocole. A partir du 22ème jour après injection, les tumeurs développées par les cellules MDAA+luc formaient des tumeurs significativement moins importantes que les cellules MDAPluc ($p<0.05$, -40%). Cette différence a également été observée jusqu'à la fin du protocole. De plus, nous avons observé que les tumeurs des cellules MDAA-luc avaient des tailles significativement différentes entre chaque point de mesure alors que les tumeurs des cellules MDAPluc et plus particulièrement les tumeurs des cellules MDAA+luc avaient un ralentissement du développement tumoral à partir du 36ème jour après injection. La taille de ces tumeurs luminescentes a également été mesurée de façon externe et des résultats similaires ont été observés. Des résultats similaires ont également été obtenus pour les modèles MA-, MP et MA+ et pour les modèles MDAA-, MDAP et MDAA+ avec mesures externes du diamètre moyen de la tumeur.

Ces résultats ont démontré que le niveau d'expression d'Arl2 influence la capacité de croissance tumorale *in vivo* probablement par un effet sur les mécanismes d'inhibition de contact décrit précédemment.

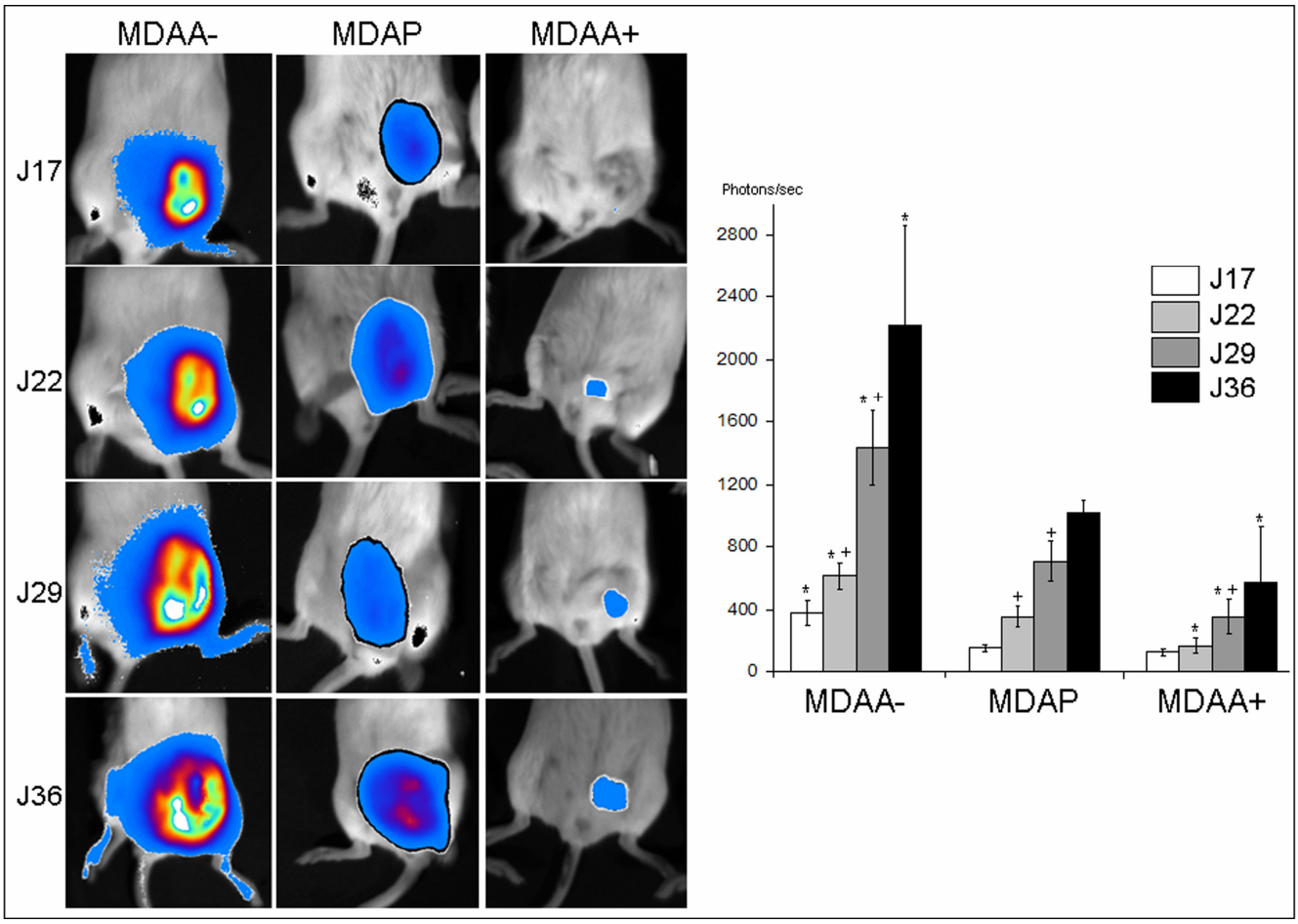


Figure 39 : Evaluation du développement tumoral et intratumoral in vivo des cellules MDAA-luc, MDAPluc et MDAA+luc. Gauche : images représentatives de l'évolution au cours du temps (jours) d'une même tumeur développée à partir de cellules injectées au niveau de la graisse mammaire abdominale de souris scid. Droite : volumes tumoraux moyens évalués par la mesure de la bioluminesence tumoral (photons/sec) sur au moins 5 souris différentes par jours et par lignées cellulaires. La signification statistique a été déterminé par le t-test de Student (* : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées, + : $p<0,05$ entre la mesure d'intérêt et la mesure précédente pour une même lignée cellulaire).

7.2.4. L'organisation intratumorale et le pouvoir d'infiltration des cellules sont dépendants du niveau d'expression d'Arl2

Le suivi *in vivo* des tumeurs bioluminescentes a permis de suivre l'évolution de l'organisation intratumorale. Les images présentées sont représentatives de l'ensemble des tumeurs de chaque lignée (figure 39). Les tumeurs des cellules MDAA+luc ont une organisation tumorale homogène sans variation de luminescence à l'intérieur de la tumeur. Les tumeurs des cellules MDAPluc montrent une organisation plus hétérogène que les tumeurs des cellules MDAA+luc (avec une ou deux zones légèrement plus luminescentes que le reste la tumeur visible au 36ème jour). Les tumeurs des cellules MDAA-luc présentent une organisation intratumorale très hétérogène avec différentes zones à valeur de bioluminescence très différentes dès le 17ème jour de croissance. De plus, pour l'ensemble des tumeurs MDAA-luc, nous avons observé une modification au cours du temps de l'organisation interne des tumeurs. Les foyers cellulaires à forte luminescence se déplacent et/ou se multiplient au fur et à mesure du développement de la tumeur. Ceci peut être interprété comme une « dynamicité intratumorale » accrue. Il est à remarquer que la présence de bioluminescence au niveau des pattes postérieures est due uniquement à la diffusion de lumière du foyer principal et non à un envahissement des membres postérieurs par des cellules tumorales.

Les tumeurs ont été prélevées à différents temps de la croissance tumorale après euthanasie des souris. Les analyses anatomo-pathologiques (service d'anatomo-pathologie du Centre Léon Bérard (Dr.I.Treilleux)) ont révélé que l'ensemble des tumeurs développées à partir des cellules à fort niveau d'Arl2 présentaient précocement des zones de mortalité cellulaire dès le 22ème jour de

croissance (figure 40). Ces plages de mortalité cellulaire représentaient 15% du volume total des tumeurs des cellules MDAA+luc au 22ème jour et plus 70% au 36ème jour. A l'inverse, les tumeurs des cellules à faible niveau d'Arl2 présentaient une apparition tardive de la mortalité cellulaire (au 36ème jour) uniquement au niveau des tumeurs de taille importante et ne représentant au maximum que 25% du volume tumoral au 36ème jour. Les tumeurs des cellules MDAPluc présentaient des zones de mortalité cellulaire de taille intermédiaire par rapport aux 2 autres lignées (figure 40). Des résultats similaires ont été obtenus sur des tumeurs développées à partir des modèles MA-, MP et MA+. Ces différences de pourcentage de mortalité cellulaire intratumorale peuvent expliquer les différences de taille décrites précédemment.

On peut en conclure que le niveau d'Arl2 influence fortement l'organisation intratumorale et est corrélé avec l'induction d'une mort cellulaire précoce en lien probable avec le phénomène d'inhibition de contact.

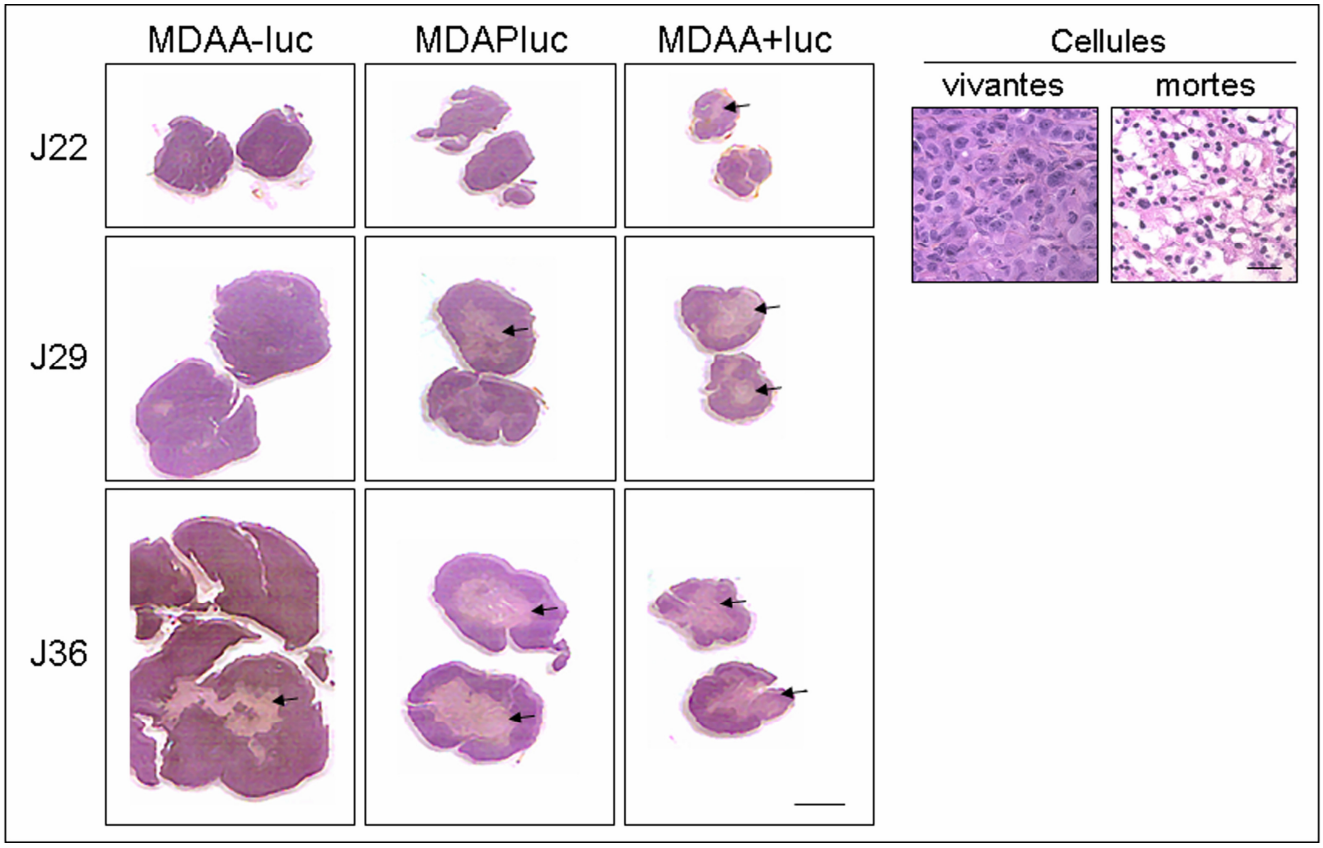


Figure 40 : Coupes histochimiques des tumeurs des cellules MDAA-luc, MDAPluc et MDAA+luc. Les tumeurs développées chez la souris après injection des cellules ont été prélevées au 22ème, 29ème et 36ème jour (J22, J29 et J36) et analysées au Centre Léon Bérard (laboratoire d'anatomo-pathologie). Gauche : Les lames des coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ont été scannées et les flèches noires indiquent les zones de mortalité cellulaire (rose pâle). La barre d'échelle correspond à 0.3 cm. Droite : Images représentatives de cellules vivantes et de cellules mortes au sein d'une tumeur. La barre d'échelle correspond à 60 µm.

Nous avons également étudié *in vitro* la capacité d'infiltration des cellules MDAA-, MDAP et MDAA+ dans un gel épais de matrigel (figure 41). Les cellules MDAA- présentaient une surface moyenne de migration supérieure à celle des cellules MDAP et les cellules MDAA+ avaient une surface moyenne de migration significativement inférieure ($p<0,05$, -70%). Les cellules MCF7 n'ayant qu'un faible pouvoir de migration à travers le matrigel, ce test n'a pu être effectué que sur les cellules dérivées de MDA-MB-231.

Ces données ont montré que le contenu en protéine Arl2 peut être associé avec le pouvoir d'infiltration de cellules de cancer du sein.

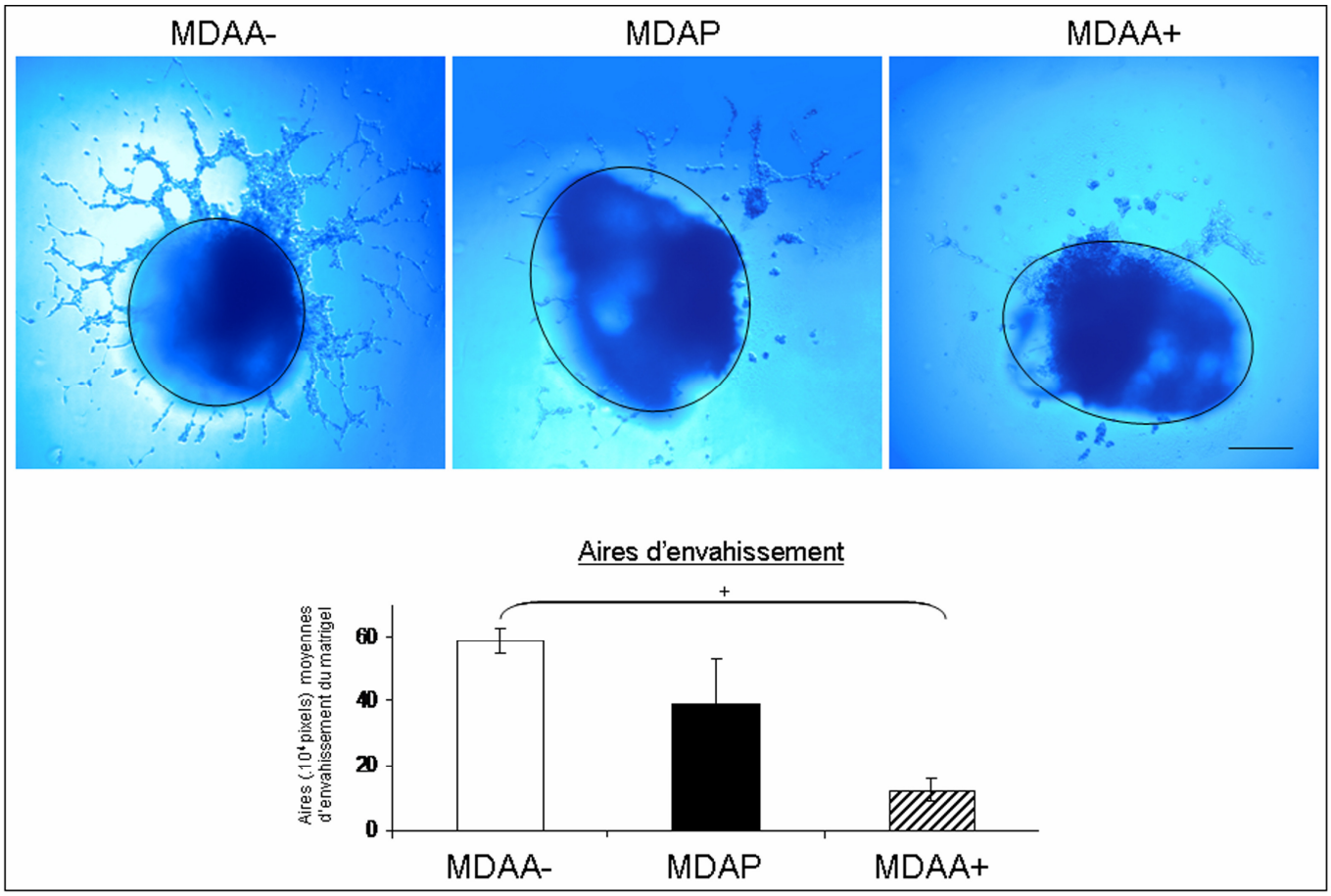


Figure 41 : Evaluation de la capacité d'infiltration in vitro des cellules MDAA-, MDAP et MDAA+. En haut : images représentatives pour chaque lignée cellulaire de l'envahissement d'un gel épais de matrigel par les cellules après 5 jours de croissance. La barre d'échelle représente 250µm. En bas : mesures de l'aire moyenne d'envahissement du matrigel en pixels2 pour chacune des lignées cellulaires. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre les cellules MDAA- et MDAA+).

Des études cliniques menées sur des échantillons de cancer du sein sont en cours afin de déterminer la pertinence clinique de nos observations faites sur différentes lignées cellulaires. Les résultats préliminaires obtenus par RT-PCR quantitative en temps réel montrent une corrélation entre niveau d'expression d'Arl2 et certains paramètres comme le grade tumoral. Nous sommes également en train de procéder à la production d'un anticorps monoclonal ciblant Arl2 pour procéder à des études immunohistochimiques de la protéine Arl2 sur des échantillons tumoraux.

Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus, nous avons mis au point la production de la protéine Arl2 purifiée et des études par RMN en phase liquide sont en cours en collaboration avec l'équipe du Pr. JM Lancelin (UMR 5180, *ANABIO*, RMN et Spectrométrie de Masse Biomoléculaire, UCBL, Lyon) afin d'identifier certains motifs chimiques se liant à la protéine Arl2.

7.3. Discussion

Nous avons démontré que, pour différents types de cellules cancéreuses, le contenu en Arl2 sauvage était associé avec des modifications de la morphologie cellulaire et nucléolaire, avec des altérations du phénomène d'inhibition de contact, ainsi qu'avec des perturbations du pouvoir clonogénique, et des modifications du développement tumoral et du pouvoir d'infiltration.

Nos résultats ont montré que le contenu en Arl2 a un impact sur la morphologie cellulaire et sur la polarité. Comme nous l'avons précédemment décrit pour les modèles MCF7, ceci peut s'expliquer par l'altération de la dynamique microtubulaire (voir paragraphe 2.3). Egalement, l'implication de PP2A dans ce phénomène ne peut être exclu car l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de PP2A et des études génétiques ont révélé, chez la levure, la drosophile et la souris, un rôle

de PP2A dans la morphologie cellulaire et le développement (Janssens *et al.*, 2001) et nos modèles possèdent des variations de la sous-unité catalytique de PP2A (PP2Ac). Les modifications morphologiques observées peuvent être dépendantes de la dynamique microtubulaire et/ou de la protéine PP2A.

Nous avons également observé des modifications au niveau de la morphologie nucéolaire des cellules MA-, MP et MA+ et d'autres résultats montrant la modification du contenu de certaines protéines nucléolaires et de la synthèse d'ARNr ont été obtenus. Il faut rappeler que PP2Ac est présent au niveau des nucléoles uniquement pour les cellules à haut niveau d'Arl2 MA+. Ces premiers résultats ont ouvert une nouvelle approche sur l'étude de l'impact de la ribogénèse dans le développement tumoral.

Nous avons observé une perturbation au niveau des phénomènes d'inhibition de contact. Des études ont récemment montré l'implication de la dynamique microtubulaire et de PP2A dans la régulation de la concentration de l'E-cadherine au niveau des contacts cellules-cellules. Stehbens *et al.* ont démontré que des microtubules étaient capables de croître radialement jusqu'aux points de contacts intercellulaires et que le blocage de la dynamique microtubulaire perturbait la capacité des cellules à accumuler l'E-cadherine au niveau de ces points de contact (Stehbens *et al.*, 2006). Takahashi *et al.* ont démontré que le traitement des cellules avec un inhibiteur spécifique de PP2A provoquait une perte des adhésions intercellulaires et ont émis l'hypothèse que PP2A pouvait jouer un rôle crucial dans la maintenance des contacts intercellulaires (Takahashi *et al.*, 2006). PP2A et/ou la dynamique microtubulaire peuvent de ce fait expliquer les modifications de l'inhibition de contact par la régulation, par exemple, de l'E-cadherine. Des tests complémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

La modification du contenu en Arl2 sauvage a été associée avec une modification du développement tumoral *in vivo*. Des perturbations du niveau d'expression et/ou de l'activité de PP2A ont été retrouvées dans différents types de tumeurs (Calin *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 1998). De plus, il est à noter que le complexe formé d'Arl2, de PP2A et du cofacteur TBC-D représente 100% de la fraction d'Arl2 cytoplasmique (Shern *et al.*, 2003). Nous pensons donc qu'Arl2 pourrait agir comme une sous-unité régulatrice de PP2A avec des conséquences fonctionnelles au niveau du développement tumoral. Cette hypothèse est également soutenue par le fait que certains virus comme le papovavirus détourne l'activité de PP2A en substituant les sous-unités régulatrices de PP2A par des protéines virales contribuant ainsi à l'oncogénèse associée à ce virus (Cegielska *et al.*, 1994, Pallas *et al.*, 1990, Sontag *et al.*, 1999).

Enfin, nous avons montré que le contenu en Arl2 pouvait être associé à un pouvoir d'infiltration, phénomène essentiel à la formation de métastase. Une forme mutante d'une sous unité régulatrice de la protéine PP2A est associé à la formation de métastase pour une lignée de cellules dérivés d'un mélanome (Ito *et al.*, 2003). Egalement, il a été montré qu'un traitement avec des concentrations d'agent anti-microtubule augmentant la dynamique des microtubules est associé avec une diminution de la motilité de cellules endothéliales (Pourroy *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données peuvent expliquer l'augmentation du pouvoir infiltrant observé ici corrélé avec un contenu en PP2A plus faible et une dynamique microtubulaire plus élevée.

En conclusion, les contenus en Arl2 et PP2A ainsi que les propriétés dynamiques des microtubules sont extrêmement liés et pourraient agir ensemble pour contrôler la croissance et le développement tumoral. Un mécanisme en cours

d'étude et incluant la modification de la ribogénèse au sein de nos modèles pourrait également être impliqué. Arl2 agirait alors comme un régulateur principal de l'ensemble de ces composés cellulaires.

8. EFFETS DE LA MODIFICATION DU NIVEAU D'ARL2 SUR LE PHENOTYPE DE CELLULES IMMORTALISEES ISSUES D'EPITHELIUM MAMMAIRE NORMAL : INDUCTION D'UN POUVOIR TUMORIGENE ?

8.1. Introduction

Nous avons précédemment montré l'influence du niveau d'expression d'Arl2 sur le phénotype des cellules cancéreuses. Parallèlement à ces études, nous avons effectué des expériences sur des cellules dérivées d'épithélium mammaire normal. En utilisant ces modèles, nous souhaitons démontrer qu'Arl2 serait capable d'influencer le phénotype de cellules non-transformées et de leur conférer un pouvoir tumorigène.

Nous rappelons que les cellules HA+ présentaient une augmentation significative ($p<0,05$, +30%) et les cellules HA- une diminution significative ($p<0,05$, -30%) du contenu en protéine Arl2 et PP2Ac par rapport aux cellules HP (données non représentées).

8.2. Résulats

8.2.1. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la morphologie et la polarité des cellules immortalisées

Comme pour les cellules tumorales, les cellules HA- étaient significativement plus petites ($p<0.05$, -20 à 30%) et les HA+ plus grandes ($p<0.05$, +30% à 35%) que les cellules HP (figure 42). Aucune différence au niveau de la circularité moyenne de ces cellules n'a été observée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules HA- possédaient une déviation standard importante due à la présence de cellules non polarisées et circulaires non visibles pour les lignées cellulaires HP et HA+.

De la même façon que pour les cellules cancéreuses, les cellules immortalisées avec un plus faible niveau d'Arl2 semblent acquérir une morphologie se rapprochant de cellules pré-cancéreuses sans polarisation.

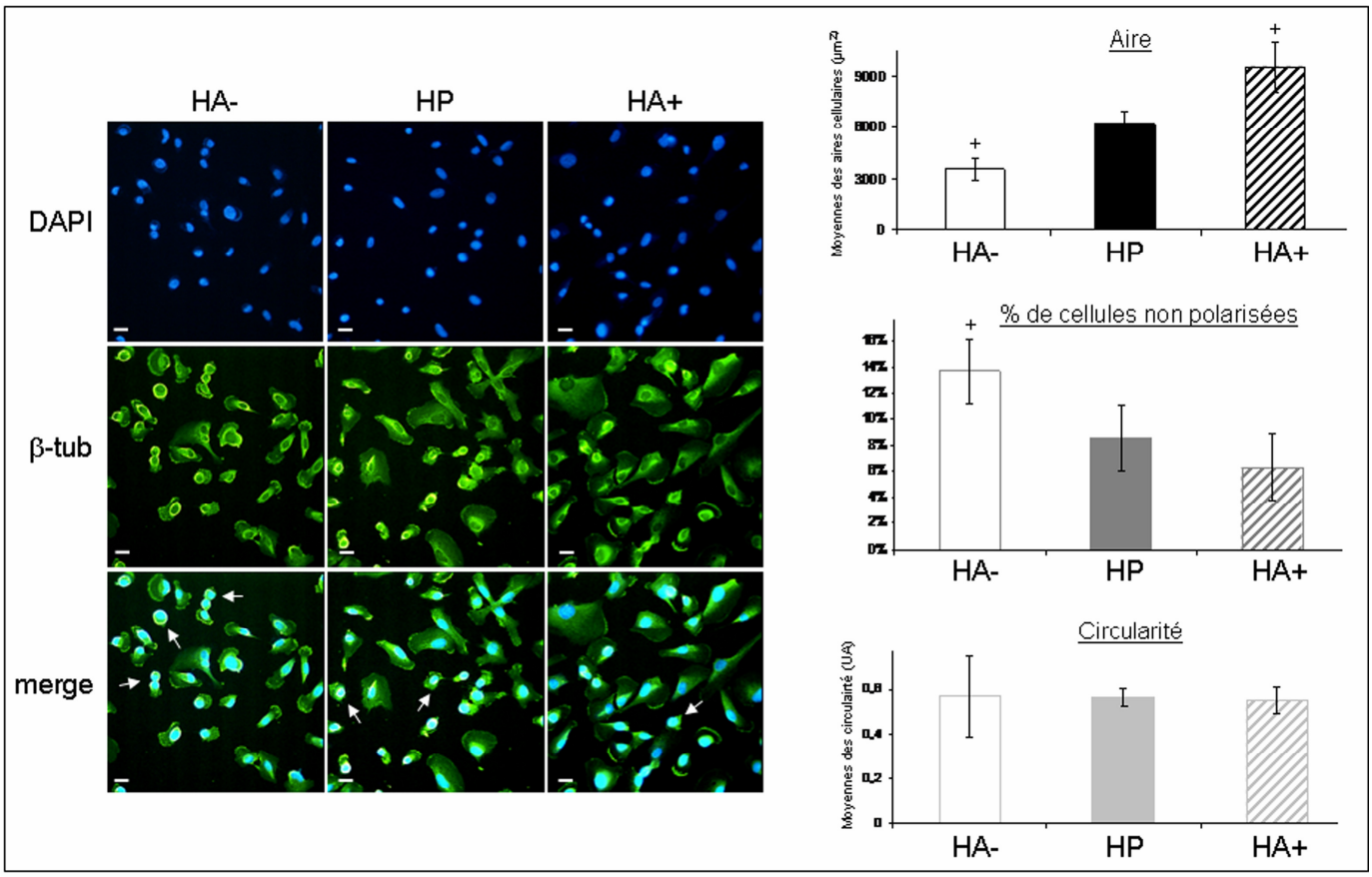


Figure 42 : Analyses morphologiques des modèles cellulaires HA-, HP et HA+. Images représentatives des cellules HA-,HP et HA+ après marquage de l'ADN au DAPI (bleu), de la β-tubuline (β-tub, vert) et moyennes des aires (μm^2) et de la circularité ces cellules évaluées par microscopie confocale pour au moins 200 cellules sur au moins 3 images différentes. Les flèches blanches marquent les cellules rondes sans polarisation visible (cellules HA+). Les barres d'échelle correspondent à 10 µm. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

8.2.2. Le contenu en Arl2 induit des perturbations de la ploïdie des cellules immortalisées

En cytométrie de flux, les cellules HA- présentaient, à l'état basal, une population cellulaire ayant une quantité d'ADN égale à 8N. Cette population représentait environ 4% de la population totale (figure 43a). Cette population n'a pas été observée dans les autres cellules immortalisées HP et HA+ ni dans les autres cellules cancéreuses. Nous avons ensuite procédé au tri des cellules HA- par cytométrie de flux comme illustré par la figure 43a. Deux populations cellulaires ont été obtenues (HA-2N et les HA-8N). Nous avons observé que les cellules HA-8N sont des cellules vivantes et adhérentes avec une morphologie modifiée par rapport aux cellules HA-2N (figure 43a). Les cellules HA-8N apparaissaient plus étalées et plus rondes que les cellules HA-2N avec absence de polarisation pour la plupart d'entre elles. En effet, la position du noyau pour les cellules HA-8N était au centre de la cellule et on ne peut distinguer de structures correspondantes à un front de migration alors que les cellules HA-2N présentaient des structures cellulaires identifiables à un front de migration (flèches noires). Les cellules HA-2N ont été analysées par cytométrie 10 jours après avoir été triées et une nouvelle population 8N a été détectée, ce qui laisse supposer que les cellules HA- seraient capables de produire des cellules à 8N d'ADN au fur et à mesure de la culture cellulaire (figure 43b). Nous avons exposé les cellules HA-2N au taxol et avons observé que le pourcentage de cellules 8N augmentées significativement ($p<0,05$, X2) dans les cellules incubées au taxol par rapport aux cellules non exposées (figure 43b). Par conséquent, la population de cellules 8N semble correspondre à une fraction de cellules en phase G2/M d'une population tétraploïde. Ceci expliquerait

l'augmentation de la population 4N observée pour les cellules HA- par rapport aux cellules HP et HA+ car cette population correspond à la fois aux cellules en phase G2/M de la population diploïde de base et aux cellules en phase G0-G1 de la population tétraploïde.

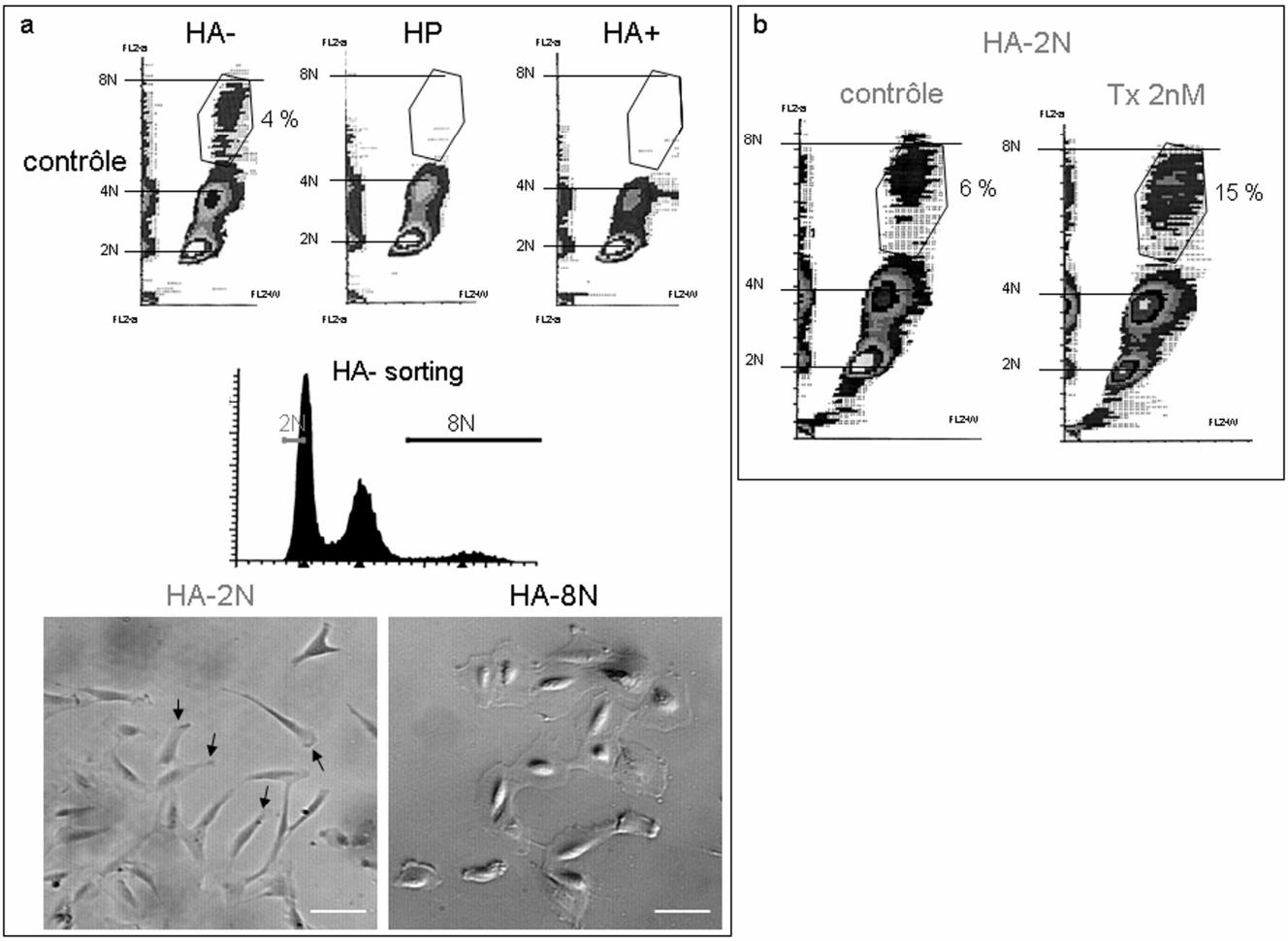


Figure 43 : Distributions en cycle cellulaire des cellules HA-, HP et HA+ à l'état de base. a : en haut : distributions cellulaires représentatives des cellules évaluées par cytométrie de flux sur des cellules non exposées et correspondance en contenu d'ADN (2N, 4N, et 8N). Le pourcentage indiqué correspond à la population 8N détectée. Au milieu : schéma représentatif du tri cellulaire effectué sur les cellules HA- selon le contenu en ADN (2N et 8N). Bas : Image représentatives des cellules HA-2N et HA-8N prises 6 jours après le tri cellulaire. Les barres d'échelles représentent 20 µm. Les flèches noires correspondent aux structures assimilables aux fronts de migration. b : Distributions en cycle cellulaire représentatives des cellules HA-2N non exposées et exposées à 2nM de taxol et correspondance en contenu d'ADN (2N, 4N et 8N) effectuées 10 jours après de tri cellulaire. Les pourcentages indiqués correspondent aux populations 8N détectées.

8.2.3. Le contenu en Arl2 induit des perturbations de la réponse aux traitements des cellules immortalisées

Nous avons incubé les cellules HA-, HP et HA+ avec du taxol et de la vinorelbine et observé l'apparition d'une population 8N ainsi que celle d'une population sub G0-G1 (figure 44). Les cellules HA+ possédaient une fraction 8N inférieur à 1% après ces traitements ce qui était significativement ($p<0,05$) plus faible que la fraction 8N induite par ces agents des cellules HP (3 à 5%) elles-mêmes inférieures à la fraction 8N des cellules HA- exposées (7 à 9%). De plus, la population sub G0-G1 était significativement plus élevée dans les cellules HA+ après incubation au taxol ou à la vinorelbine ($p<0,05$, respectivement X1,2 et X4) par rapport aux cellules exposées HP et HA-. A l'inverse, les cellules HA- exposées à la vinorelbine présentaient 2 fois moins ($p<0,05$) de cellules en sub G0-G1 que les 2 autres lignées cellulaires. Il est difficile d'interpréter le pourcentage des cellules en phase G2/M car la population 4N des cellules HA- comporte des cellules tétraploïdes en phase G0-G1

L'ensemble de ces résultats démontre que le niveau d'expression d'Arl2 peut influencer le contenu chromosomique et qu'un niveau plus élevé d'Arl2 semble protéger les cellules immortalisées contre la tétraploïdisation après exposition aux agents antitumoraux.

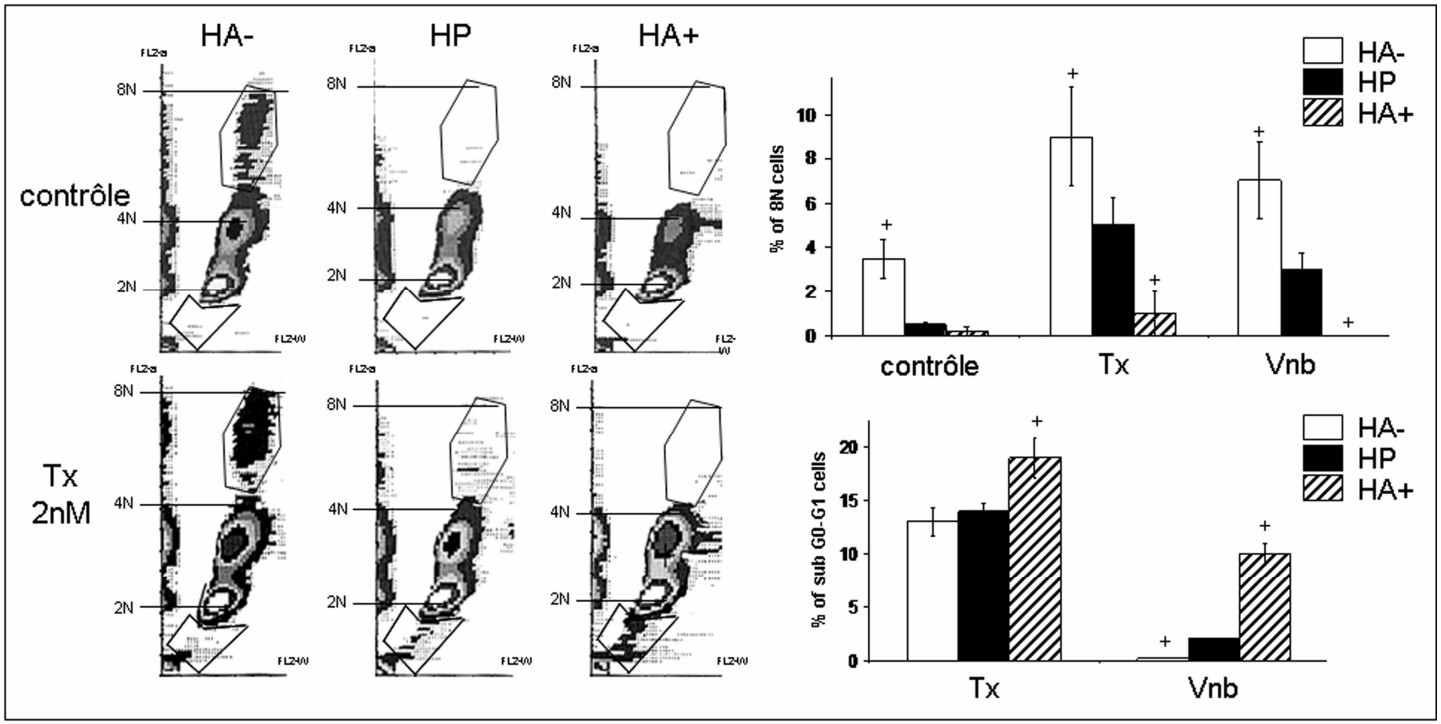


Figure 44 : Effets de traitements antitumoraux sur la distribution en cycle des cellules HA-, HP et HA+. Distributions en cycle des cellules évaluées par cytométrie de flux sur cellules non exposées (contrôle) et après exposition avec 2nM de taxol (Tx) ou 2 nM de vinorelbine (Vnb). Gauche : graphes de distributions en cycle représentatifs de chaque modèle cellulaire; en haut à droite : moyennes des pourcentages des cellules comportant 8N d'ADN ; en bas à droite : moyennes des pourcentages des cellules en sub G0-G1. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Les données sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes et la signification statistique a été déterminée par le t-test de Student (+ : $p < 0.05$ entre la lignée cellulaire d'intérêt et les autres lignées).

8.2.4. Le niveau d'expression d'Arl2 influence la croissance tridimensionnelle *in vitro* des cellules immortalisées

Nous avons étudié la capacité de croissance tridimensionnelle des cellules HA+ et HP en matrigel (figure 45). Les résultats préliminaires montrent, comme pour les cellules cancéreuses dérivées des MCF7, que les colonies formées à partir des cellules à haut niveau d'Arl2 HA+ sont significativement plus petites que celles des cellules témoins HP. Des études complémentaires sont en cours pour analyser la capacité de croissance tridimensionnelle de l'ensemble des lignées cellulaires HA-, HP, HA+ et HA-8N.

La capacité de tumorogénèse *in vivo* de nos cellules dérivées de cellules immortalisées est en cours d'évaluation dans des modèles murins.

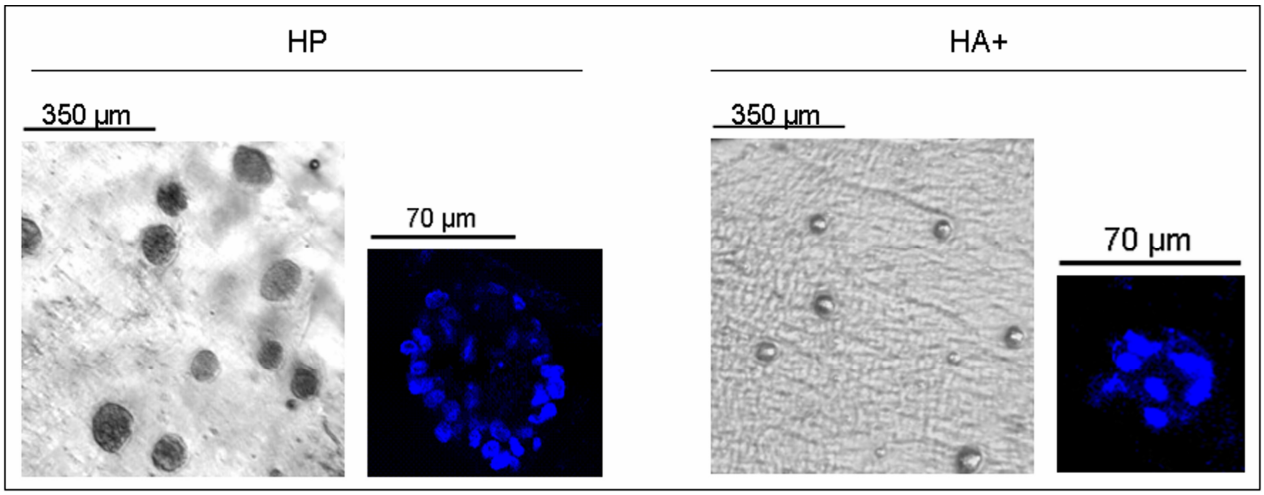


Figure 45 : Croissance tridimensionnelle in vitro des cellules HP et HA+. Images représentatives de la morphologie des colonies cellulaires en gel de matrigel pur après 17 jours de culture. Les images ont été prises en lumière blanche (gauche) et après marquage des colonies au DAPI (droite). Les correspondances des barres d'échelles sont indiquées sur la figure.

8.3. Discussion

Ces résultats ont montré l'implication d'Arl2 dans la perturbation de la morphologie, de la ploïdie et de la réponse aux traitements de cellules immortalisées d'épithélium mammaire.

Nous avons observé les mêmes modifications au niveau de la morphologie cellulaire que pour les cellules tumorales. Ceci suggère que le mode d'action d'Arl2 dans le contrôle de la morphologie a été conservé entre les différentes lignées cellulaires utilisées pour ces travaux.

De plus, nous avons démontré une influence d'Arl2 sur la ploïdie des cellules. Des perturbations au niveau de la ploïdie n'ont pas été observées pour les différentes lignées cancéreuses utilisées précédemment. Ceci peut être dû au fait que ces cellules cancéreuses présentent des perturbations du contenu chromosomique importantes (voir description des lignées, section matériels et méthodes). Des perturbations supplémentaires de la ploïdie pourraient alors être fatales pour ces cellules. L'ensemble des résultats présentés ici suggère que des perturbations du niveau d'expression d'Arl2 pourraient provoquer des altérations au niveau de certains points de contrôle de la mitose. Des analyses complémentaires sont en cours afin d'identifier ces points de contrôle.

Comme nous l'avons précédemment décrit, il existe une corrélation forte entre perturbations de la ploïdie et acquisition du phénotype cancéreux. De ce fait, la perte de contrôle de la ploïdie observée dans les cellules à faible niveau d'Arl2 pourrait conférer une capacité de tumorogénèse à des cellules immortalisées non pathogènes.

9. DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail, nous avons montré que le niveau d'expression de la protéine Arl2 influence fortement la morphologie cellulaire (plus particulièrement l'étalement cellulaire), la distribution des fractions de tubulines solubles, la dynamique microtubulaire et la progression du cycle cellulaire dans 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome mammaire. Des progrès majeurs ont été réalisés dans la compréhension de la dynamique microtubulaire et de ses processus régulateurs. La plupart des avancées ont été obtenues dans le domaine des protéines accessoires des microtubules telles que les MAPs ou Op18. Néanmoins, peu de choses sont connues au sujet de l'impact de la mise en conformation des tubulines et de ses intervenants sur la régulation de la dynamique des microtubules. Nos résultats obtenus dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome mammaire suggèrent que la régulation du processus précoce de mise en conformation joue un rôle important dans la régulation des propriétés du cytosquelette microtubulaire.

Nous avons montré que des altérations du contenu en Arl2 étaient associées avec des différences dans la sensibilité aux agents antitumoraux des cellules dérivées de MCF7. Nos données suggèrent que des modifications de la localisation et de la phosphorylation de p53 sont impliquées dans ces différences de sensibilité par un mécanisme dépendant de PP2A. Nous pouvons conclure qu'une diminution d'Arl2 peut, par un mécanisme dépendant de PP2A, induire une augmentation d'au moins une forme de phosphorylation de p53 (ser 15) qui se lie préférentiellement aux microtubules. Dans ces cellules, p53 peut ne pas être transloqué suffisamment dans le noyau après exposition aux traitements chimiothérapeutiques. Nous pouvons donc supposer que des stratégies thérapeutiques visant à augmenter le

contenu protéique d'Arl2 induirait une plus grande sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements.

Nous avons démontré que, pour différents types de cellules cancéreuses, le niveau d'expresssion de la protéine Arl2 était associé à des modifications de la morphologie cellulaire et nucléolaire, à des altérations du phénomène d'inhibition de contact, ainsi qu'à des perturbations du pouvoir clonogénique, et des modifications du développement tumorale et du pouvoir d'infiltration. Les contenus en Arl2 et PP2A ainsi que les propriétés dynamiques des microtubules apparaissent alors extrêmement liés et pourraient agir ensemble pour contrôler la croissance et le développement tumoral. Arl2 pourrait être défini à termes comme gène suppresseur de tumeur.

D'autres résultats obtenus sur des modèles de cellules immortalisées ont montré l'implication d'Arl2 dans la perturbation de la morphologie, de la ploïdie et de la réponse aux traitements de ces cellules. Des études complémentaires sont en cours sur ces modèles afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués et également afin d'étudier *in vivo* les pouvoirs tumorigènes potentiels de ces modèles. Certains éléments nous laissent supposer que des perturbations du niveau d'expression d'Arl2 pourraient constituer un point de départ à la transformation tumorale de cellules issues d'épithélium mammaire.

10. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Arl2 (ADP Ribosylation Factor-like Protein 2) est une protéine qui régule l'action de certaines protéines chaperonnes des tubulines. En utilisant des modèles de cancer du sein, nous avons montré dans ce travail que des modifications de l'expression d'Arl2 induisent (1) des perturbations importantes de la dynamique microtubulaire et de la mitose ; (2) une chimiorésistance à différents agents anticancéreux par un mécanisme dépendant de la phosphatase PP2A et du facteur de transcription p53 ainsi que (3) des modifications de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus ont permis d'établir, pour la première fois, un lien entre des événements régulant la production de tubulines fonctionnelles et des perturbations au niveau des phénotypes microtubulaires et cellulaires de cellules cancéreuses humaines. Des études sont en cours avec d'autres laboratoires afin de (1) déterminer s'il existe un lien entre Arl2, ribogénèse et progression tumorale, (2) d'élaborer des motifs chimiques ciblant Arl2 et (3) de démontrer plus précisément l'implication d'Arl2 dans des processus précoces de tumorogénèse. Les avantages à considérer Arl2 comme cible de stratégies thérapeutiques sont nombreux (taille modérée, forme monomérique, mutations géniques rares …). Cependant, il est important de souligner la nécessité d'études cliniques à la suite de ces études fondamentales. Ce travail constitue donc une première étape dans l'étude de processus régulant la formation de tubulines fonctionnelles et ouvre des perspectives dans la détermination de nouveaux facteurs influençant le processus de carcinogénèse et de chimiorésistance.

PARTIE III :
REFERENCES

11. REFERENCES

1. Alexandrova, N., et al., *The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 5188-95.
2. Altundag, K., et al., *Which is better in neoadjuvant treatment of breast cancer? Taxane followed by anthracyline or vice versa.* Breast Cancer Res Treat, 2006. **97**(2): p. 221.
3. Amos, L.A. and J. Lowe, *How Taxol stabilises microtubule structure.* Chem Biol, 1999. **6**(3): p. R65-9.
4. Andre, N., et al., *Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells.* FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 256-60.
5. Apodaca, G., *Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton.* Traffic, 2001. **2**(3): p. 149-59.
6. Archer, J.E., et al., *Formation and function of the Rbl2p-beta-tubulin complex.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1757-62.
7. Archer, J.E., L.R. Vega, and F. Solomon, *Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo.* Cell, 1995. **82**(3): p. 425-34.
8. Arnal, I., et al., *CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues.* Curr Biol, 2004. **14**(23): p. 2086-95.
9. Audebert, S., et al., *Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons.* J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 8)**: p. 2313-22.
10. Baas, P.W. and L. Qiang, *Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock.* Trends Cell Biol, 2005. **15**(4): p. 183-7.
11. Barral, J.M., et al., *Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 17-29.
12. Bartolini, F., et al., *Functional overlap between retinitis pigmentosa 2 protein and the tubulin-specific chaperone cofactor C.* J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14629-34.
13. Bhamidipati, A., S.A. Lewis, and N.J. Cowan, *ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin.* J Cell Biol, 2000. **149**(5): p. 1087-96.
14. Bialojan, C. and A. Takai, *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics.* Biochem J, 1988. **256**(1): p. 283-90.
15. Bode, C.J., et al., *The two alpha-tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro.* EMBO Rep, 2003. **4**(1): p. 94-9.
16. Boman, A.L. and R.A. Kahn, *Arf proteins: the membrane traffic police?* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(4): p. 147-50.
17. Bonnet, C., et al., *Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation.* J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12839-48.
18. Borisy, G.G. and T.M. Svitkina, *Actin machinery: pushing the envelope.* Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 104-12.
19. Bouhouche, A., et al., *Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal*

recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia. J Med Genet, 2006. **43**(5): p. 441-3.
20. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity.* Science, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
21. Bourgarel-Rey, V., et al., *Involvement of nuclear factor kappaB in c-Myc induction by tubulin polymerization inhibitors.* Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 1165-70.
22. Brattsand, G., et al., *Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38.* Eur J Biochem, 1994. **220**(2): p. 359-68.
23. Breiner, M., et al., *Cloning of a novel member (ARL5) of the ARF-family of Ras-related GTPases.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1308**(1): p. 1-6.
24. Brooks, C.L. and W. Gu, *Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 164-71.
25. Calin, G.A., et al., *Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms.* Oncogene, 2000. **19**(9): p. 1191-5.
26. Carvalho, P., et al., *Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation.* Dev Cell, 2004. **6**(6): p. 815-29.
27. Casazza, A.M. and C.R. Fairchild, *Paclitaxel (Taxol): mechanisms of Resistance.* Cancer Treat Res, 1996. **87**: p. 149-71.
28. Cassimeris, L., *Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(1): p. 134-41.
29. Caudron, N., et al., *A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro.* J Mol Biol, 2000. **297**(1): p. 211-20.
30. Cegielska, A., et al., *Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4616-23.
31. Chang, P. and T. Stearns, *Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. 30-5.
32. Chen, J.G. and S.B. Horwitz, *Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs.* Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 1935-8.
33. Choisy-Rossi, C., P. Reisdorf, and E. Yonish-Rouach, *Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death.* Toxicol Lett, 1998. **102-103**: p. 491-6.
34. Chretien, D., S.D. Fuller, and E. Karsenti, *Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates.* J Cell Biol, 1995. **129**(5): p. 1311-28.
35. Clark, J., et al., *Selective amplification of additional members of the ADP-ribosylation factor (ARF) family: cloning of additional human and Drosophila ARF-like genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8952-6.
36. Correia, J.J. and S. Lobert, *Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs.* Curr Pharm Des, 2001. **7**(13): p. 1213-28.
37. Curmi, P.A., et al., *The stathmin/tubulin interaction in vitro.* J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25029-36.
38. Debnath, J., S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.* Methods, 2003. **30**(3): p. 256-68.

39. Derry, W.B., et al., *Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes.* Biochemistry, 1997. **36**(12): p. 3554-62.
40. Desai, A., et al., *Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes.* Cell, 1999. **96**(1): p. 69-78.
41. Dhamodharan, R. and P. Wadsworth, *Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 4)**: p. 1679-89.
42. Dohoney, K.M., et al., *Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to DNA damage.* Oncogene, 2004. **23**(1): p. 49-57.
43. Downing, K.H. and E. Nogales, *New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin.* Eur Biophys J, 1998. **27**(5): p. 431-6.
44. Downing, K.H. and E. Nogales, *Tubulin and microtubule structure.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(1): p. 16-22.
45. Drechsel, D.N., et al., *Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.* Mol Biol Cell, 1992. **3**(10): p. 1141-54.
46. Drewes, G., et al., *Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state.* Embo J, 1992. **11**(6): p. 2131-8.
47. Duesberg, P., et al., *How aneuploidy may cause cancer and genetic instability.* Anticancer Res, 1999. **19**(6A): p. 4887-906.
48. Dumaz, N. and D.W. Meek, *Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2.* Embo J, 1999. **18**(24): p. 7002-10.
49. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, *Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?* J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 208-21.
50. Dumontet, C., *Mechanisms of action and resistance to tubulin-binding agents.* Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(4): p. 779-88.
51. Dumontet, C., et al., *Expression of class III beta tubulin in non-small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy.* Bull Cancer, 2005. **92**(2): p. E25-30.
52. Dutcher, S.K., *Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily.* Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(6): p. 634-40.
53. el-Deiry, W.S., *Regulation of p53 downstream genes.* Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 345-57.
54. Enomoto, K. and D.M. Gill, *Cholera toxin activation of adenylate cyclase. Roles of nucleoside triphosphates and a macromolecular factor in the ADP ribosylation of the GTP-dependent regulatory component.* J Biol Chem, 1980. **255**(4): p. 1252-8.
55. Erck, C., et al., *A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 7853-8.
56. Estevez, L.G. and W.J. Gradishar, *Evidence-based use of neoadjuvant taxane in operable and inoperable breast cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3249-61.
57. Evans, R.J., et al., *Assay and functional analysis of the ARL3 effector RP2 involved in X-linked retinitis pigmentosa.* Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 468-80.

58. Fanarraga, M.L., et al., *Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis.* Cell Motil Cytoskeleton, 1999. **43**(3): p. 243-54.
59. Feierbach, B., et al., *Alf1p, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin.* J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 113-24.
60. Feinberg, A.P., S. Rainier, and M.R. DeBaun, *Genomic imprinting, DNA methylation, and cancer.* J Natl Cancer Inst Monogr, 1995(17): p. 21-6.
61. Ferlini, C., et al., *The seco-taxane IDN5390 is able to target class III beta-tubulin and to overcome paclitaxel resistance.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2397-405.
62. Fiore, R.S., et al., *Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate receptor stimulation in rat primary cortical cultures.* J Neurochem, 1993. **61**(5): p. 1626-33.
63. Fleming, J.A., L.R. Vega, and F. Solomon, *Function of tubulin binding proteins in vivo.* Genetics, 2000. **156**(1): p. 69-80.
64. Fojo, T., *p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53.* Drug Resist Updat, 2002. **5**(5): p. 209-16.
65. Fontalba, A., et al., *Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis.* J Cell Sci, 1993. **106 (Pt 2)**: p. 627-32.
66. Fourest-Lieuvin, A., et al., *Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(3): p. 1041-50.
67. Fujiki, H. and M. Suganuma, *Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds.* Adv Cancer Res, 1993. **61**: p. 143-94.
68. Fukata, M., et al., *Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170.* Cell, 2002. **109**(7): p. 873-85.
69. Galigniana, M.D., et al., *Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus.* J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22483-9.
70. Galjart, N., *CLIPs and CLASPs and cellular dynamics.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 487-98.
71. Galmarini, C.M., et al., *A p21/WAF1 mutation favors the appearance of drug resistance to paclitaxel in human noncancerous epithelial mammary cells.* Int J Cancer, 2006. **119**(1): p. 60-6.
72. Galmarini, C.M., et al., *Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine.* Int J Cancer, 2002. **97**(4): p. 439-45.
73. Galmarini, C.M., et al., *Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity.* Br J Cancer, 2001. **85**(6): p. 902-8.
74. Galmarini, C.M., et al., *Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics.* Br J Cancer, 2003. **88**(11): p. 1793-9.
75. Garel, J.R., D. Job, and R.L. Margolis, *Model of anaphase chromosome movement based on polymer-guided diffusion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(11): p. 3599-603.
76. Gehringer, M.M., *Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response.* FEBS Lett, 2004. **557**(1-3): p. 1-8.
77. Gergely, F., V.M. Draviam, and J.W. Raff, *The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells.* Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 336-41.

78. Giannakakou, P., et al., *Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10855-60.
79. Giannakakou, P., et al., *Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity.* Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3806-13.
80. Giannakakou, P., et al., *p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 709-17.
81. Gigant, B., et al., *Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine.* Nature, 2005. **435**(7041): p. 519-22.
82. Goble, S. and H.D. Bear, *Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions.* Surg Clin North Am, 2003. **83**(4): p. 943-71.
83. Goncalves, A., et al., *Caspase-8 activation independent of CD95/CD95-L interaction during paclitaxel-induced apoptosis in human colon cancer cells (HT29-D4).* Biochem Pharmacol, 2000. **60**(11): p. 1579-84.
84. Goodson, H.V., et al., *CLIP-170 interacts with dynactin complex and the APC-binding protein EB1 by different mechanisms.* Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **55**(3): p. 156-73.
85. Grishchuk, E.L. and J.R. McIntosh, *Sto1p, a fission yeast protein similar to tubulin folding cofactor E, plays an essential role in mitotic microtubule assembly.* J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 12)**: p. 1979-88.
86. Gundersen, G.G. and J.C. Bulinski, *Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin.* Eur J Cell Biol, 1986. **42**(2): p. 288-94.
87. Gundersen, G.G., S. Khawaja, and J.C. Bulinski, *Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation.* J Cell Biol, 1989. **109**(5): p. 2275-88.
88. Gutmann, E.J., et al., *Colchicine-induced redistribution of an apical membrane glycoprotein (gp330) in proximal tubules.* Am J Physiol, 1989. **257**(2 Pt 1): p. C397-407.
89. Guzik, B.W. and L.S. Goldstein, *Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 443-50.
90. Hamilton, A. and G. Hortobagyi, *Chemotherapy: what progress in the last 5 years?* J Clin Oncol, 2005. **23**(8): p. 1760-75.
91. Haneda, M., et al., *Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53.* FEBS Lett, 2004. **567**(2-3): p. 171-4.
92. Hanzal-Bayer, M., et al., *The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function.* Embo J, 2002. **21**(9): p. 2095-106.
93. Hari, M., et al., *Mutations in alpha- and beta-tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine.* Mol Cancer Ther, 2003. **2**(7): p. 597-605.
94. Hari, M., et al., *Expression of class III beta-tubulin reduces microtubule assembly and confers resistance to paclitaxel.* Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **56**(1): p. 45-56.

95. Harris, J., M. Morrow, and L. Norton, *Malignant tumors of the breast*, in *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 1997, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p. 1557-1616.
96. Hasan, M.R., et al., *Differences in the regulation of microtubule stability by the pro-rich region variants of microtubule-associated protein 4.* FEBS Lett, 2006. **580**(14): p. 3505-10.
97. Heinemann, V., *Role of gemcitabine in the treatment of advanced and metastatic breast cancer.* Oncology, 2003. **64**(3): p. 191-206.
98. Hill, B.T., *Vinflunine, a second generation novel Vinca Alkaloid with a distinctive pharmacological profile, now in clinical development and prospects for future mitotic blockers.* Curr Pharm Des, 2001. **7**(13): p. 1199-212.
99. Hill, B.T., et al., *Superior in vivo experimental antitumour activity of vinflunine, relative to vinorelbine, in a panel of human tumour xenografts.* Eur J Cancer, 1999. **35**(3): p. 512-20.
100. Hiser, L., et al., *Comparison of beta-tubulin mRNA and protein levels in 12 human cancer cell lines.* Cell Motil Cytoskeleton, 2006. **63**(1): p. 41-52.
101. Honore, S., E. Pasquier, and D. Braguer, *Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(24): p. 3039-56.
102. Hoyt, M.A., et al., *Saccharomyces cerevisiae PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability.* Genetics, 1997. **146**(3): p. 849-57.
103. Hoyt, M.A., T. Stearns, and D. Botstein, *Chromosome instability mutants of Saccharomyces cerevisiae that are defective in microtubule-mediated processes.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(1): p. 223-34.
104. Huang, J., et al., *APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9049-54.
105. Huang, Y., et al., *Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-kappaB/IkappaB pathway in human tumor cells.* Mol Cancer Ther, 2004. **3**(3): p. 271-7.
106. Inoue, S., *The role of microtubule assembly dynamics in mitotic force generation and functional organization of living cells.* J Struct Biol, 1997. **118**(2): p. 87-93.
107. Ito, A., et al., *A truncated isoform of the protein phosphatase 2A B56gamma regulatory subunit may promote genetic instability and cause tumor progression.* Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 81-91.
108. Itoh, T.J. and H. Hotani, *Microtubule dynamics and the regulation by microtubule-associated proteins (MAPs).* Biol Sci Space, 2004. **18**(3): p. 116-7.
109. Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling.* Biochem J, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
110. Janssens, V., J. Goris, and C. Van Hoof, *PP2A: the expected tumor suppressor.* Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 34-41.
111. Jimenez, G.S., et al., *p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses.* Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7656-65.
112. Job, D., C.T. Rauch, and R.L. Margolis, *High concentrations of STOP protein induce a microtubule super-stable state.* Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(1): p. 429-34.

113. Job, D., O. Valiron, and B. Oakley, *Microtubule nucleation.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(1): p. 111-7.
114. Jordan, M.A., *Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin.* Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2002. **2**(1): p. 1-17.
115. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(1): p. 123-30.
116. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.
117. Jordheim, L.P., et al., *Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5614-21.
118. Jordheim, L.P., et al., *Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells.* Mol Cancer Ther, 2005. **4**(8): p. 1268-76.
119. Jourdain, I., et al., *A synergistic relationship between three regions of stathmin family proteins is required for the formation of a stable complex with tubulin.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 3): p. 877-88.
120. Kahn, R.A., et al., *Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins.* J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 645-50.
121. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin.* J Biol Chem, 1984. **259**(10): p. 6228-34.
122. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein.* J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7906-11.
123. Kahn, R.A., et al., *The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport.* J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 13039-46.
124. Kamath, K., et al., *BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability.* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12902-7.
125. Kavallaris, M., et al., *Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells.* Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5803-9.
126. Kavallaris, M., N.M. Verrills, and B.T. Hill, *Anticancer therapy with novel tubulin-interacting drugs.* Drug Resist Updat, 2001. **4**(6): p. 392-401.
127. Keller, C.E. and B.P. Lauring, *Possible regulation of microtubules through destabilization of tubulin.* Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 571-3.
128. Kim, I.S., et al., *Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53.* J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23139-45.
129. Komarova, Y.A., et al., *Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo.* J Cell Biol, 2002. **159**(4): p. 589-99.
130. Kortazar, D., et al., *Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation.* Exp Cell Res, 2006.
131. Kruczynski, A. and B.T. Hill, *Vinflunine, the latest Vinca alkaloid in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties.* Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **40**(2): p. 159-73.
132. Kubota, H., *Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT.* Vitam Horm, 2002. **65**: p. 313-31.

133. Kuge, O., et al., *Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments.* J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 51-65.
134. Lain, S., D. Xirodimas, and D.P. Lane, *Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function.* Exp Cell Res, 1999. **253**(2): p. 315-24.
135. Lambert, P.F., et al., *Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP.* J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 33048-53.
136. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome.* Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
137. Lane, D.P., *Worrying about p53.* Curr Biol, 1992. **2**(11): p. 581-3.
138. Lanni, J.S. and T. Jacks, *Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 1055-64.
139. Lansbergen, G., et al., *Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization.* J Cell Biol, 2004. **166**(7): p. 1003-14.
140. Larsson, N., et al., *Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5530-9.
141. Larsson, N., et al., *G2/M transition requires multisite phosphorylation of oncoprotein 18 by two distinct protein kinase systems.* J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 14175-83.
142. Lasko, D., W. Cavenee, and M. Nordenskjold, *Loss of constitutional heterozygosity in human cancer.* Annu Rev Genet, 1991. **25**: p. 281-314.
143. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process.* Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
144. Lechward, K., et al., *Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions.* Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 921-33.
145. Lee, M.J., et al., *Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(15): p. 1917-25.
146. Leguy, R., et al., *Monomeric gamma -tubulin nucleates microtubules.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21975-80.
147. Lewis, S.A., et al., *Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin.* J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 1-4.
148. Li, Y., et al., *Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in C. elegans.* Faseb J, 2004. **18**(15): p. 1834-50.
149. Lippincott-Schwartz, J. and N.B. Cole, *Roles for microtubules and kinesin in membrane traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex.* Biochem Soc Trans, 1995. **23**(3): p. 544-8.
150. Liu, L., et al., *p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1202-9.
151. Llorca, O., et al., *Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations.* Embo J, 2000. **19**(22): p. 5971-9.
152. Lopez-Fanarraga, M., et al., *Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics.* J Struct Biol, 2001. **135**(2): p. 219-29.
153. Lu, Q. and R.F. Luduena, *In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in*

the absence of microtubule-associated proteins. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2041-7.
154. MacKintosh, C. and R.W. MacKintosh, *Inhibitors of protein kinases and phosphatases.* Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 444-8.
155. MacRae, T.H., *Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action.* Eur J Biochem, 1997. **244**(2): p. 265-78.
156. Mandelkow, E.M., E. Mandelkow, and R.A. Milligan, *Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study.* J Cell Biol, 1991. **114**(5): p. 977-91.
157. Maney, T., M. Wagenbach, and L. Wordeman, *Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin.* J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34753-8.
158. Margolis, R.L., et al., *Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells.* Embo J, 1990. **9**(12): p. 4095-502.
159. Margolis, R.L. and L. Wilson, *Microtubule treadmilling: what goes around comes around.* Bioessays, 1998. **20**(10): p. 830-6.
160. Margolis, R.L., L. Wilson, and B.I. Keifer, *Mitotic mechanism based on intrinsic microtubule behaviour.* Nature, 1978. **272**(5652): p. 450-2.
161. Martin, L., et al., *Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein.* FEBS Lett, 2000. **470**(1): p. 93-5.
162. Martin, M., et al., *Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **352**(22): p. 2302-13.
163. Martin, N., et al., *A missense mutation in Tbce causes progressive motor neuronopathy in mice.* Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 443-7.
164. Maxwell, S.A., et al., *Simian virus 40 large T antigen and p53 are microtubule-associated proteins in transformed cells.* Cell Growth Differ, 1991. **2**(2): p. 115-27.
165. McKean, P.G., S. Vaughan, and K. Gull, *The extended tubulin superfamily.* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 15): p. 2723-33.
166. Messner, D.J., et al., *Inhibition of PP2A, but not PP5, mediates p53 activation by low levels of okadaic acid in rat liver epithelial cells.* J Cell Biochem, 2006.
167. Mikhailov, A. and G.G. Gundersen, *Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol.* Cell Motil Cytoskeleton, 1998. **41**(4): p. 325-40.
168. Million, K., et al., *Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells.* J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 23)**: p. 4357-66.
169. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A.* Trends Biochem Sci, 1999. **24**(5): p. 186-91.
170. Mimori, K., et al., *Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment.* Br J Cancer, 2006. **94**(12): p. 1894-7.
171. Mimori-Kiyosue, Y., et al., *CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex.* J Cell Biol, 2005. **168**(1): p. 141-53.
172. Minshull, J., et al., *Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast.* Curr Biol, 1996. **6**(12): p. 1609-20.

173. Morris, V.B., et al., *p53 localizes to the centrosomes and spindles of mitotic cells in the embryonic chick epiblast, human cell lines, and a human primary culture: An immunofluorescence study.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 122-30.
174. Mozzetti, S., et al., *Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 298-305.
175. Murtagh, J.J., Jr., et al., *Guanine nucleotide-binding proteins in the intestinal parasite Giardia lamblia. Isolation of a gene encoding an approximately 20-kDa ADP-ribosylation factor.* J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9654-62.
176. Nagata, K., et al., *The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3.* Embo J, 1998. **17**(1): p. 149-58.
177. Newton, C.N., et al., *Intrinsically slow dynamic instability of HeLa cell microtubules in vitro.* J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42456-62.
178. Ngan, V.K., et al., *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine.* Mol Pharmacol, 2001. **60**(1): p. 225-32.
179. Ngan, V.K., et al., *Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules.* Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5045-51.
180. Nie, Z., D.S. Hirsch, and P.A. Randazzo, *Arf and its many interactors.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 396-404.
181. Nogales, E. and H.W. Wang, *Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why?* Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(2): p. 179-84.
182. Nogales, E., H.W. Wang, and H. Niederstrasser, *Tubulin rings: which way do they curve?* Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(2): p. 256-61.
183. Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing, *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.* Nature, 1998. **391**(6663): p. 199-203.
184. Noritake, J., et al., *IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 10): p. 2085-92.
185. Nowak, A.K., et al., *Systematic review of taxane-containing versus non-taxane-containing regimens for adjuvant and neoadjuvant treatment of early breast cancer.* Lancet Oncol, 2004. **5**(6): p. 372-80.
186. Oakley, B.R., *An abundance of tubulins.* Trends Cell Biol, 2000. **10**(12): p. 537-42.
187. O'Brate, A. and P. Giannakakou, *The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?* Drug Resist Updat, 2003. **6**(6): p. 313-22.
188. Ookata, K., et al., *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, 1995. **128**(5): p. 849-62.
189. Pallas, D.C., et al., *Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A.* Cell, 1990. **60**(1): p. 167-76.
190. Panda, D., et al., *Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11358-62.
191. Parvari, R., et al., *Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome.* Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 448-52.

192. Pasquier, E., et al., *Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2433-40.
193. Peterson, R.T., et al., *Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycinassociated protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4438-42.
194. Pierce, L.J., et al., *Conservative surgery and radiotherapy for stage I/II breast cancer using lung density correction: 10-year and 15-year results.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(5): p. 1317-27.
195. Pihan, G.A. and S.J. Doxsey, *The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer.* Semin Cancer Biol, 1999. **9**(4): p. 289-302.
196. Pihan, G.A., et al., *Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors.* Cancer Res, 1998. **58**(17): p. 3974-85.
197. Pourroy, B., et al., *Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest and a mitochondrial pathway.* Mol Pharmacol, 2004. **66**(3): p. 580-91.
198. Pourroy, B., et al., *Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3256-63.
199. Prigozhina, N.L., et al., *{gamma}-Tubulin Plays an Essential Role in the Coordination of Mitotic Events.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1374-1386.
200. Quaroni, A., K. Kirsch, and M.M. Weiser, *Synthesis of membrane glycoproteins in rat small-intestinal villus cells. Effect of colchicine on the redistribution of L-[1,5,6-3H]fucose-labelled membrane glycoproteins among Golgi, lateral basal and microvillus membranes.* Biochem J, 1979. **182**(1): p. 213-21.
201. Radcliffe, P., et al., *Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2-tubulin genes as fission yeast polarity mutants.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(7): p. 1757-71.
202. Radcliffe, P.A. and T. Toda, *Characterisation of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B.* Mol Gen Genet, 2000. **263**(5): p. 752-60.
203. Radcliffe, P.A., L. Vardy, and T. Toda, *A conserved small GTP-binding protein Alp41 is essential for the cofactor-dependent biogenesis of microtubules in fission yeast.* FEBS Lett, 2000. **468**(1): p. 84-8.
204. Redeker, V., et al., *Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules.* Science, 1994. **266**(5191): p. 1688-91.
205. Robin, P., B. Rossignol, and M.N. Raymond, *Effect of microtubule network disturbance by nocodazole and docetaxel (Taxotere) on protein secretion in rat extraorbital lacrimal and parotid glands.* Eur J Cell Biol, 1995. **67**(3): p. 227-37.
206. Rodriguez-Boulan, E. and W.J. Nelson, *Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype.* Science, 1989. **245**(4919): p. 718-25.
207. Rodriguez-Boulan, E. and P.J. Salas, *External and internal signals for epithelial cell surface polarization.* Annu Rev Physiol, 1989. **51**: p. 741-54.
208. Rommelaere, H., et al., *Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11975-9.
209. Rosenbaum, J., *Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last.* Curr Biol, 2000. **10**(21): p. R801-3.

210. Rosette, C. and M. Karin, *Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B.* J Cell Biol, 1995. **128**(6): p. 1111-9.
211. Rouzier, R., et al., *Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8315-20.
212. Ruiz, F., et al., *The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in Paramecium, encodes a novel tubulin, eta-tubulin.* Curr Biol, 2000. **10**(22): p. 1451-4.
213. Sakorafas, G.H. and A.G. Tsiotou, *Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective.* Br J Surg, 2000. **87**(2): p. 149-62.
214. Salaycik, K.J., et al., *Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 18): p. 4113-22.
215. Salman, H., et al., *Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules.* Biophys J, 2005. **89**(3): p. 2134-45.
216. Sanchez, C., et al., *Phosphorylation and dephosphorylation in the proline-rich C-terminal domain of microtubule-associated protein 2.* Eur J Biochem, 1996. **241**(3): p. 765-71.
217. Schild, A., L.M. Ittner, and J. Gotz, *Altered phosphorylation of cytoskeletal proteins in mutant protein phosphatase 2A transgenic mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(4): p. 1171-8.
218. Schuller, E., et al., *Brain t-complex polypeptide 1 (TCP- 1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease.* Life Sci, 2001. **69**(3): p. 263-70.
219. Schwahn, U., et al., *Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2.* Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 327-32.
220. Seve, P., et al., *Expression of class III {beta}-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(15): p. 5481-6.
221. Seve, P., et al., *Class III beta-tubulin is a marker of paclitaxel resistance in carcinomas of unknown primary site.* Cancer Chemother Pharmacol, 2006.
222. Sewell, J.L. and R.A. Kahn, *Sequences of the bovine and yeast ADP-ribosylation factor and comparison to other GTP-binding proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4620-4.
223. Shannon, C. and I. Smith, *Is there still a role for neoadjuvant therapy in breast cancer?* Crit Rev Oncol Hematol, 2003. **45**(1): p. 77-90.
224. Sharer, J.D., et al., *ARL2 and BART enter mitochondria and bind the adenine nucleotide transporter.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 71-83.
225. Sheeman, B., et al., *Determinants of S. cerevisiae dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning.* Curr Biol, 2003. **13**(5): p. 364-72.
226. Shern, J.F., et al., *Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A.* J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40829-36.
227. Sillje, H.H. and E.A. Nigg, *Purification of mitotic spindles from cultured human cells.* Methods, 2006. **38**(1): p. 25-8.
228. Simons, C.T., et al., *Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding.* J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4196-203.
229. Smrzka, O.W., N. Delgehyr, and M. Bornens, *Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian delta-tubulin.* Curr Biol, 2000. **10**(7): p. 413-6.

230. Sontag, E., et al., *Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies.* J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25490-8.
231. Southwood, C.M., et al., *Microtubule Deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the Nervous System.* Neurochem Res, 2006.
232. Stehbens, S.J., et al., *Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1801-11.
233. Storchova, Z. and D. Pellman, *From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 45-54.
234. Straight, A.F. and C.M. Field, *Microtubules, membranes and cytokinesis.* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R760-70.
235. Strickland, L.I., E.J. Donnelly, and D.R. Burgess, *Induction of cytokinesis is independent of precisely regulated microtubule dynamics.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4485-94.
236. Sullivan, K.F. and D.W. Cleveland, *Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4327-31.
237. Sullivan, K.F. and L. Wilson, *Developmental and biochemical analysis of chick brain tubulin heterogeneity.* J Neurochem, 1984. **42**(5): p. 1363-71.
238. Takahashi, K., E. Nakajima, and K. Suzuki, *Involvement of protein phosphatase 2A in the maintenance of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion through recruitment of IQGAP1.* J Cell Physiol, 2006. **206**(3): p. 814-20.
239. Tamkun, J.W., et al., *The arflike gene encodes an essential GTP-binding protein in Drosophila.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3120-4.
240. Tar, K., et al., *Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation.* J Cell Biochem, 2004. **92**(3): p. 534-46.
241. Tar, K., et al., *Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure.* J Cell Biochem, 2006. **98**(4): p. 931-53.
242. Tassin, A.M. and M. Bornens, *Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells.* Biol Cell, 1999. **91**(4-5): p. 343-54.
243. Thazhath, R., C. Liu, and J. Gaertig, *Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in Tetrahymena.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(3): p. 256-9.
244. Thompson, T., et al., *Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53015-22.
245. Thyberg, J. and S. Moskalewski, *Role of microtubules in the organization of the Golgi complex.* Exp Cell Res, 1999. **246**(2): p. 263-79.
246. Tian, G., et al., *Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer.* J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24054-8.
247. Tian, G., et al., *Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors.* J Cell Biol, 1997. **138**(4): p. 821-32.
248. Tian, G., et al., *Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding.* J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 23910-3.
249. Tian, G., et al., *Specificity in chaperonin-mediated protein folding.* Nature, 1995. **375**(6528): p. 250-3.

250. Tournebize, R., et al., *Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis.* Embo J, 1997. **16**(18): p. 5537-49.
251. Trinczek, B., et al., *Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules.* Mol Biol Cell, 1995. **6**(12): p. 1887-902.
252. Tritarelli, A., et al., *p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3751-7.
253. Urano, N., et al., *Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer.* Int J Oncol, 2006. **28**(2): p. 375-81.
254. Vadlamudi, R.K., et al., *p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3726-36.
255. Vainberg, I.E., et al., *Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin.* Cell, 1998. **93**(5): p. 863-73.
256. Van Hoof, C. and J. Goris, *Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1640**(2-3): p. 97-104.
257. Varbiro, G., et al., *Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition.* Free Radic Biol Med, 2001. **31**(4): p. 548-58.
258. Vasiliev, J.M., *Actin cortex and microtubular system in morphogenesis: cooperation and competition.* J Cell Sci Suppl, 1987. **8**: p. 1-18.
259. Vasiliev, J.M. and I.M. Gelfand, *Mechanisms of morphogenesis in cell cultures.* Int Rev Cytol, 1977. **50**: p. 159-274.
260. Vasiliev, J.M., et al., *Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts.* J Embryol Exp Morphol, 1970. **24**(3): p. 625-40.
261. Vaughan, S., et al., *New tubulins in protozoal parasites.* Curr Biol, 2000. **10**(7): p. R258-9.
262. Vega, L.R., J. Fleming, and F. Solomon, *An alpha-tubulin mutant destabilizes the heterodimer: phenotypic consequences and interactions with tubulin-binding proteins.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(9): p. 2349-60.
263. Veitia, R., et al., *Tau expression in model adenocarcinomas correlates with docetaxel sensitivity in tumour-bearing mice.* Br J Cancer, 1998. **78**(7): p. 871-7.
264. Velculescu, V.E., et al., *Characterization of the yeast transcriptome.* Cell, 1997. **88**(2): p. 243-51.
265. Verlhac, M.H., et al., *MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes.* Dev Biol, 1993. **158**(2): p. 330-40.
266. Verrills, N.M. and M. Kavallaris, *Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies.* Curr Pharm Des, 2005. **11**(13): p. 1719-33.
267. Verrills, N.M., et al., *Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia--an in vivo study.* Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1681-94.
268. Verrills, N.M., et al., *Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(19): p. 1363-74.

269. Visscher, D.W., T.L. Wallis, and J.D. Crissman, *Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics.* Cancer, 1996. **77**(2): p. 315-20.
270. Vousden, K.H. and G.F. Woude, *The ins and outs of p53.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. E178-80.
271. Wadsworth, P., *Mitosis: spindle assembly and chromosome motion.* Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(1): p. 123-8.
272. Wagner, P., et al., *Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: a novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo.* Cell Cycle, 2005. **4**(9): p. 1149-52.
273. Walden, P.D., et al., *Recognition of specific Physarum alpha-tubulin isotypes by a monoclonal antibody. Sequence heterogeneity around the acetylation site at lysine 40.* Eur J Biochem, 1989. **185**(2): p. 383-9.
274. Walker, R.A., et al., *Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies.* J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1437-48.
275. Wang, S.S., et al., *Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer.* Science, 1998. **282**(5387): p. 284-7.
276. Wang, Y., et al., *Mutations affecting beta-tubulin folding and degradation.* J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13628-35.
277. Wang, Y., et al., *Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms.* Biochemistry, 2006. **45**(1): p. 185-94.
278. Waters, J.C., et al., *The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work.* Mol Biol Cell, 1996. **7**(10): p. 1547-58.
279. Webster, D.R., et al., *Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9040-4.
280. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 938-47.
281. Yoo, B.C., et al., *Expression patterns of chaperone proteins in cerebral cortex of the fetus with Down syndrome: dysregulation of T-complex protein 1.* J Neural Transm Suppl, 2001(61): p. 321-34.
282. Yu, J. and L. Zhang, *No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis.* Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 248-9.
283. Zhai, Y. and G.G. Borisy, *Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer present during the mitosis-interphase transition.* J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 4)**: p. 881-90.
284. Zhai, Y., P.J. Kronebusch, and G.G. Borisy, *Kinetochore microtubule dynamics and the metaphase-anaphase transition.* J Cell Biol, 1995. **131**(3): p. 721-34.
285. Zhai, Y., et al., *Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis.* J Cell Biol, 1996. **135**(1): p. 201-14.
286. Zhang, C.C., et al., *The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells.* Oncogene, 1998. **16**(12): p. 1617-24.
287. Zhou, C., et al., *Arl2 and Arl3 Regulate Different Microtubule-dependent Processes.* Mol Biol Cell, 2006.
288. Zuo, Z., N.M. Dean, and R.E. Honkanen, *Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of*

p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12250-8.

Références

1. Alexandrova, N., et al., *The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 5188-95.
2. Altundag, K., et al., *Which is better in neoadjuvant treatment of breast cancer? Taxane followed by anthracyline or vice versa.* Breast Cancer Res Treat, 2006. **97**(2): p. 221.
3. Amos, L.A. and J. Lowe, *How Taxol stabilises microtubule structure.* Chem Biol, 1999. **6**(3): p. R65-9.
4. Andre, N., et al., *Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells.* FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 256-60.
5. Apodaca, G., *Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton.* Traffic, 2001. **2**(3): p. 149-59.
6. Archer, J.E., et al., *Formation and function of the Rbl2p-beta-tubulin complex.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1757-62.
7. Archer, J.E., L.R. Vega, and F. Solomon, *Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo.* Cell, 1995. **82**(3): p. 425-34.
8. Arnal, I., et al., *CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues.* Curr Biol, 2004. **14**(23): p. 2086-95.
9. Audebert, S., et al., *Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons.* J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 8)**: p. 2313-22.
10. Baas, P.W. and L. Qiang, *Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock.* Trends Cell Biol, 2005. **15**(4): p. 183-7.
11. Barral, J.M., et al., *Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 17-29.
12. Bartolini, F., et al., *Functional overlap between retinitis pigmentosa 2 protein and the tubulin-specific chaperone cofactor C.* J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14629-34.
13. Bhamidipati, A., S.A. Lewis, and N.J. Cowan, *ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin.* J Cell Biol, 2000. **149**(5): p. 1087-96.
14. Bialojan, C. and A. Takai, *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics.* Biochem J, 1988. **256**(1): p. 283-90.
15. Bode, C.J., et al., *The two alpha-tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro.* EMBO Rep, 2003. **4**(1): p. 94-9.

Références

16. Boman, A.L. and R.A. Kahn, *Arf proteins: the membrane traffic police?* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(4): p. 147-50.
17. Bonnet, C., et al., *Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation.* J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12839-48.
18. Borisy, G.G. and T.M. Svitkina, *Actin machinery: pushing the envelope.* Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 104-12.
19. Bouhouche, A., et al., *Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia.* J Med Genet, 2006. **43**(5): p. 441-3.
20. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity.* Science, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
21. Bourgarel-Rey, V., et al., *Involvement of nuclear factor kappaB in c-Myc induction by tubulin polymerization inhibitors.* Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 1165-70.
22. Brattsand, G., et al., *Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38.* Eur J Biochem, 1994. **220**(2): p. 359-68.
23. Breiner, M., et al., *Cloning of a novel member (ARL5) of the ARF-family of Ras-related GTPases.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1308**(1): p. 1-6.
24. Brooks, C.L. and W. Gu, *Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 164-71.
25. Calin, G.A., et al., *Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms.* Oncogene, 2000. **19**(9): p. 1191-5.
26. Carvalho, P., et al., *Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation.* Dev Cell, 2004. **6**(6): p. 815-29.
27. Casazza, A.M. and C.R. Fairchild, *Paclitaxel (Taxol): mechanisms of Resistance.* Cancer Treat Res, 1996. **87**: p. 149-71.
28. Cassimeris, L., *Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(1): p. 134-41.
29. Caudron, N., et al., *A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro.* J Mol Biol, 2000. **297**(1): p. 211-20.
30. Cegielska, A., et al., *Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4616-23.
31. Chang, P. and T. Stearns, *Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. 30-5.
32. Chen, J.G. and S.B. Horwitz, *Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs.* Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 1935-8.
33. Choisy-Rossi, C., P. Reisdorf, and E. Yonish-Rouach, *Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death.* Toxicol Lett, 1998. **102-103**: p. 491-6.
34. Chretien, D., S.D. Fuller, and E. Karsenti, *Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates.* J Cell Biol, 1995. **129**(5): p. 1311-28.

Références

35. Clark, J., et al., *Selective amplification of additional members of the ADP-ribosylation factor (ARF) family: cloning of additional human and Drosophila ARF-like genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8952-6.
36. Correia, J.J. and S. Lobert, *Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs.* Curr Pharm Des, 2001. **7**(13): p. 1213-28.
37. Curmi, P.A., et al., *The stathmin/tubulin interaction in vitro.* J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25029-36.
38. Debnath, J., S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.* Methods, 2003. **30**(3): p. 256-68.
39. Derry, W.B., et al., *Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes.* Biochemistry, 1997. **36**(12): p. 3554-62.
40. Desai, A., et al., *Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes.* Cell, 1999. **96**(1): p. 69-78.
41. Dhamodharan, R. and P. Wadsworth, *Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 4)**: p. 1679-89.
42. Dohoney, K.M., et al., *Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to DNA damage.* Oncogene, 2004. **23**(1): p. 49-57.
43. Downing, K.H. and E. Nogales, *New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin.* Eur Biophys J, 1998. **27**(5): p. 431-6.
44. Downing, K.H. and E. Nogales, *Tubulin and microtubule structure.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(1): p. 16-22.
45. Drechsel, D.N., et al., *Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.* Mol Biol Cell, 1992. **3**(10): p. 1141-54.
46. Drewes, G., et al., *Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state.* Embo J, 1992. **11**(6): p. 2131-8.
47. Duesberg, P., et al., *How aneuploidy may cause cancer and genetic instability.* Anticancer Res, 1999. **19**(6A): p. 4887-906.
48. Dumaz, N. and D.W. Meek, *Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2.* Embo J, 1999. **18**(24): p. 7002-10.
49. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, *Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?* J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 208-21.
50. Dumontet, C., *Mechanisms of action and resistance to tubulin-binding agents.* Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(4): p. 779-88.
51. Dumontet, C., et al., *Expression of class III beta tubulin in non-small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy.* Bull Cancer, 2005. **92**(2): p. E25-30.
52. Dutcher, S.K., *Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily.* Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(6): p. 634-40.
53. el-Deiry, W.S., *Regulation of p53 downstream genes.* Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 345-57.
54. Enomoto, K. and D.M. Gill, *Cholera toxin activation of adenylate cyclase. Roles of nucleoside triphosphates and a macromolecular factor in the ADP*

ribosylation of the GTP-dependent regulatory component. J Biol Chem, 1980. **255**(4): p. 1252-8.
55. Erck, C., et al., *A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 7853-8.
56. Estevez, L.G. and W.J. Gradishar, *Evidence-based use of neoadjuvant taxane in operable and inoperable breast cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3249-61.
57. Evans, R.J., et al., *Assay and functional analysis of the ARL3 effector RP2 involved in X-linked retinitis pigmentosa.* Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 468-80.
58. Fanarraga, M.L., et al., *Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis.* Cell Motil Cytoskeleton, 1999. **43**(3): p. 243-54.
59. Feierbach, B., et al., *Alf1p, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin.* J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 113-24.
60. Feinberg, A.P., S. Rainier, and M.R. DeBaun, *Genomic imprinting, DNA methylation, and cancer.* J Natl Cancer Inst Monogr, 1995(17): p. 21-6.
61. Ferlini, C., et al., *The seco-taxane IDN5390 is able to target class III beta-tubulin and to overcome paclitaxel resistance.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2397-405.
62. Fiore, R.S., et al., *Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate receptor stimulation in rat primary cortical cultures.* J Neurochem, 1993. **61**(5): p. 1626-33.
63. Fleming, J.A., L.R. Vega, and F. Solomon, *Function of tubulin binding proteins in vivo.* Genetics, 2000. **156**(1): p. 69-80.
64. Fojo, T., *p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53.* Drug Resist Updat, 2002. **5**(5): p. 209-16.
65. Fontalba, A., et al., *Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis.* J Cell Sci, 1993. **106 (Pt 2)**: p. 627-32.
66. Fourest-Lieuvin, A., et al., *Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(3): p. 1041-50.
67. Fujiki, H. and M. Suganuma, *Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds.* Adv Cancer Res, 1993. **61**: p. 143-94.
68. Fukata, M., et al., *Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170.* Cell, 2002. **109**(7): p. 873-85.
69. Galigniana, M.D., et al., *Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus.* J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22483-9.
70. Galjart, N., *CLIPs and CLASPs and cellular dynamics.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 487-98.
71. Galmarini, C.M., et al., *A p21/WAF1 mutation favors the appearance of drug resistance to paclitaxel in human noncancerous epithelial mammary cells.* Int J Cancer, 2006. **119**(1): p. 60-6.
72. Galmarini, C.M., et al., *Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine.* Int J Cancer, 2002. **97**(4): p. 439-45.
73. Galmarini, C.M., et al., *Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity.* Br J Cancer, 2001. **85**(6): p. 902-8.

Références

74. Galmarini, C.M., et al., *Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics.* Br J Cancer, 2003. **88**(11): p. 1793-9.
75. Garel, J.R., D. Job, and R.L. Margolis, *Model of anaphase chromosome movement based on polymer-guided diffusion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(11): p. 3599-603.
76. Gehringer, M.M., *Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response.* FEBS Lett, 2004. **557**(1-3): p. 1-8.
77. Gergely, F., V.M. Draviam, and J.W. Raff, *The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells.* Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 336-41.
78. Giannakakou, P., et al., *Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10855-60.
79. Giannakakou, P., et al., *Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity.* Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3806-13.
80. Giannakakou, P., et al., *p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 709-17.
81. Goble, S. and H.D. Bear, *Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions.* Surg Clin North Am, 2003. **83**(4): p. 943-71.
82. Goncalves, A., et al., *Caspase-8 activation independent of CD95/CD95-L interaction during paclitaxel-induced apoptosis in human colon cancer cells (HT29-D4).* Biochem Pharmacol, 2000. **60**(11): p. 1579-84.
83. Goodson, H.V., et al., *CLIP-170 interacts with dynactin complex and the APC-binding protein EB1 by different mechanisms.* Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **55**(3): p. 156-73.
84. Grishchuk, E.L. and J.R. McIntosh, *Sto1p, a fission yeast protein similar to tubulin folding cofactor E, plays an essential role in mitotic microtubule assembly.* J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 12)**: p. 1979-88.
85. Gundersen, G.G. and J.C. Bulinski, *Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin.* Eur J Cell Biol, 1986. **42**(2): p. 288-94.
86. Gundersen, G.G., S. Khawaja, and J.C. Bulinski, *Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation.* J Cell Biol, 1989. **109**(5): p. 2275-88.
87. Gutmann, E.J., et al., *Colchicine-induced redistribution of an apical membrane glycoprotein (gp330) in proximal tubules.* Am J Physiol, 1989. **257**(2 Pt 1): p. C397-407.
88. Guzik, B.W. and L.S. Goldstein, *Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 443-50.
89. Hamilton, A. and G. Hortobagyi, *Chemotherapy: what progress in the last 5 years?* J Clin Oncol, 2005. **23**(8): p. 1760-75.
90. Haneda, M., et al., *Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53.* FEBS Lett, 2004. **567**(2-3): p. 171-4.

Références

91. Hanzal-Bayer, M., et al., *The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function.* Embo J, 2002. **21**(9): p. 2095-106.
92. Hari, M., et al., *Mutations in alpha- and beta-tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine.* Mol Cancer Ther, 2003. **2**(7): p. 597-605.
93. Hari, M., et al., *Expression of class III beta-tubulin reduces microtubule assembly and confers resistance to paclitaxel.* Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **56**(1): p. 45-56.
94. Harris, J., M. Morrow, and L. Norton, *Malignant tumors of the breast*, in *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 1997, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p. 1557-1616.
95. Hasan, M.R., et al., *Differences in the regulation of microtubule stability by the pro-rich region variants of microtubule-associated protein 4.* FEBS Lett, 2006. **580**(14): p. 3505-10.
96. Heinemann, V., *Role of gemcitabine in the treatment of advanced and metastatic breast cancer.* Oncology, 2003. **64**(3): p. 191-206.
97. Hill, B.T., *Vinflunine, a second generation novel Vinca Alkaloid with a distinctive pharmacological profile, now in clinical development and prospects for future mitotic blockers.* Curr Pharm Des, 2001. **7**(13): p. 1199-212.
98. Hill, B.T., et al., *Superior in vivo experimental antitumour activity of vinflunine, relative to vinorelbine, in a panel of human tumour xenografts.* Eur J Cancer, 1999. **35**(3): p. 512-20.
99. Hiser, L., et al., *Comparison of beta-tubulin mRNA and protein levels in 12 human cancer cell lines.* Cell Motil Cytoskeleton, 2006. **63**(1): p. 41-52.
100. Honore, S., E. Pasquier, and D. Braguer, *Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(24): p. 3039-56.
101. Hoyt, M.A., et al., *Saccharomyces cerevisiae PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability.* Genetics, 1997. **146**(3): p. 849-57.
102. Hoyt, M.A., T. Stearns, and D. Botstein, *Chromosome instability mutants of Saccharomyces cerevisiae that are defective in microtubule-mediated processes.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(1): p. 223-34.
103. Huang, J., et al., *APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9049-54.
104. Huang, Y., et al., *Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-kappaB/IkappaB pathway in human tumor cells.* Mol Cancer Ther, 2004. **3**(3): p. 271-7.
105. Inoue, S., *The role of microtubule assembly dynamics in mitotic force generation and functional organization of living cells.* J Struct Biol, 1997. **118**(2): p. 87-93.
106. Ito, A., et al., *A truncated isoform of the protein phosphatase 2A B56gamma regulatory subunit may promote genetic instability and cause tumor progression.* Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 81-91.
107. Itoh, T.J. and H. Hotani, *Microtubule dynamics and the regulation by microtubule-associated proteins (MAPs).* Biol Sci Space, 2004. **18**(3): p. 116-7.

Références

108. Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling.* Biochem J, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
109. Janssens, V., J. Goris, and C. Van Hoof, *PP2A: the expected tumor suppressor.* Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 34-41.
110. Jimenez, G.S., et al., *p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses.* Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7656-65.
111. Job, D., C.T. Rauch, and R.L. Margolis, *High concentrations of STOP protein induce a microtubule super-stable state.* Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(1): p. 429-34.
112. Job, D., O. Valiron, and B. Oakley, *Microtubule nucleation.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(1): p. 111-7.
113. Jordan, M.A., *Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin.* Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2002. **2**(1): p. 1-17.
114. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(1): p. 123-30.
115. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.
116. Jordheim, L.P., et al., *Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5614-21.
117. Jordheim, L.P., et al., *Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells.* Mol Cancer Ther, 2005. **4**(8): p. 1268-76.
118. Jourdain, I., et al., *A synergistic relationship between three regions of stathmin family proteins is required for the formation of a stable complex with tubulin.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 3): p. 877-88.
119. Kahn, R.A., et al., *Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins.* J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 645-50.
120. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin.* J Biol Chem, 1984. **259**(10): p. 6228-34.
121. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein.* J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7906-11.
122. Kahn, R.A., et al., *The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport.* J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 13039-46.
123. Kamath, K., et al., *BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability.* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12902-7.
124. Kavallaris, M., et al., *Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells.* Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5803-9.
125. Kavallaris, M., N.M. Verrills, and B.T. Hill, *Anticancer therapy with novel tubulin-interacting drugs.* Drug Resist Updat, 2001. **4**(6): p. 392-401.

Références

126. Keller, C.E. and B.P. Lauring, *Possible regulation of microtubules through destabilization of tubulin.* Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 571-3.
127. Kim, I.S., et al., *Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53.* J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23139-45.
128. Komarova, Y.A., et al., *Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo.* J Cell Biol, 2002. **159**(4): p. 589-99.
129. Kortazar, D., et al., *Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation.* Exp Cell Res, 2006.
130. Kruczynski, A. and B.T. Hill, *Vinflunine, the latest Vinca alkaloid in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties.* Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **40**(2): p. 159-73.
131. Kubota, H., *Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT.* Vitam Horm, 2002. **65**: p. 313-31.
132. Kuge, O., et al., *Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments.* J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 51-65.
133. Lain, S., D. Xirodimas, and D.P. Lane, *Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function.* Exp Cell Res, 1999. **253**(2): p. 315-24.
134. Lambert, P.F., et al., *Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP.* J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 33048-53.
135. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome.* Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
136. Lane, D.P., *Worrying about p53.* Curr Biol, 1992. **2**(11): p. 581-3.
137. Lanni, J.S. and T. Jacks, *Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 1055-64.
138. Lansbergen, G., et al., *Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization.* J Cell Biol, 2004. **166**(7): p. 1003-14.
139. Larsson, N., et al., *Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5530-9.
140. Larsson, N., et al., *G2/M transition requires multisite phosphorylation of oncoprotein 18 by two distinct protein kinase systems.* J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 14175-83.
141. Lasko, D., W. Cavenee, and M. Nordenskjold, *Loss of constitutional heterozygosity in human cancer.* Annu Rev Genet, 1991. **25**: p. 281-314.
142. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process.* Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
143. Lechward, K., et al., *Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions.* Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 921-33.
144. Lee, M.J., et al., *Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(15): p. 1917-25.
145. Leguy, R., et al., *Monomeric gamma -tubulin nucleates microtubules.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21975-80.
146. Lewis, S.A., et al., *Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin.* J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 1-4.

Références

147. Li, Y., et al., *Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in C. elegans.* Faseb J, 2004. **18**(15): p. 1834-50.
148. Lippincott-Schwartz, J. and N.B. Cole, *Roles for microtubules and kinesin in membrane traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex.* Biochem Soc Trans, 1995. **23**(3): p. 544-8.
149. Liu, L., et al., *p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1202-9.
150. Llorca, O., et al., *Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations.* Embo J, 2000. **19**(22): p. 5971-9.
151. Lopez-Fanarraga, M., et al., *Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics.* J Struct Biol, 2001. **135**(2): p. 219-29.
152. Lu, Q. and R.F. Luduena, *In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins.* J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2041-7.
153. MacKintosh, C. and R.W. MacKintosh, *Inhibitors of protein kinases and phosphatases.* Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 444-8.
154. MacRae, T.H., *Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action.* Eur J Biochem, 1997. **244**(2): p. 265-78.
155. Mandelkow, E.M., E. Mandelkow, and R.A. Milligan, *Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study.* J Cell Biol, 1991. **114**(5): p. 977-91.
156. Maney, T., M. Wagenbach, and L. Wordeman, *Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin.* J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34753-8.
157. Margolis, R.L., et al., *Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells.* Embo J, 1990. **9**(12): p. 4095-502.
158. Margolis, R.L. and L. Wilson, *Microtubule treadmilling: what goes around comes around.* Bioessays, 1998. **20**(10): p. 830-6.
159. Margolis, R.L., L. Wilson, and B.I. Keifer, *Mitotic mechanism based on intrinsic microtubule behaviour.* Nature, 1978. **272**(5652): p. 450-2.
160. Martin, L., et al., *Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein.* FEBS Lett, 2000. **470**(1): p. 93-5.
161. Martin, M., et al., *Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **352**(22): p. 2302-13.
162. Martin, N., et al., *A missense mutation in Tbce causes progressive motor neuronopathy in mice.* Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 443-7.
163. Maxwell, S.A., et al., *Simian virus 40 large T antigen and p53 are microtubule-associated proteins in transformed cells.* Cell Growth Differ, 1991. **2**(2): p. 115-27.
164. McKean, P.G., S. Vaughan, and K. Gull, *The extended tubulin superfamily.* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 15): p. 2723-33.
165. Messner, D.J., et al., *Inhibition of PP2A, but not PP5, mediates p53 activation by low levels of okadaic acid in rat liver epithelial cells.* J Cell Biochem, 2006.

166. Mikhailov, A. and G.G. Gundersen, *Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol.* Cell Motil Cytoskeleton, 1998. **41**(4): p. 325-40.
167. Million, K., et al., *Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells.* J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 23)**: p. 4357-66.
168. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A.* Trends Biochem Sci, 1999. **24**(5): p. 186-91.
169. Mimori, K., et al., *Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment.* Br J Cancer, 2006. **94**(12): p. 1894-7.
170. Mimori-Kiyosue, Y., et al., *CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex.* J Cell Biol, 2005. **168**(1): p. 141-53.
171. Minshull, J., et al., *Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast.* Curr Biol, 1996. **6**(12): p. 1609-20.
172. Morris, V.B., et al., *p53 localizes to the centrosomes and spindles of mitotic cells in the embryonic chick epiblast, human cell lines, and a human primary culture: An immunofluorescence study.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 122-30.
173. Mozzetti, S., et al., *Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 298-305.
174. Murtagh, J.J., Jr., et al., *Guanine nucleotide-binding proteins in the intestinal parasite Giardia lamblia. Isolation of a gene encoding an approximately 20-kDa ADP-ribosylation factor.* J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9654-62.
175. Nagata, K., et al., *The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3.* Embo J, 1998. **17**(1): p. 149-58.
176. Newton, C.N., et al., *Intrinsically slow dynamic instability of HeLa cell microtubules in vitro.* J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42456-62.
177. Ngan, V.K., et al., *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine.* Mol Pharmacol, 2001. **60**(1): p. 225-32.
178. Ngan, V.K., et al., *Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules.* Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5045-51.
179. Nie, Z., D.S. Hirsch, and P.A. Randazzo, *Arf and its many interactors.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 396-404.
180. Nogales, E. and H.W. Wang, *Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why?* Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(2): p. 179-84.
181. Nogales, E., H.W. Wang, and H. Niederstrasser, *Tubulin rings: which way do they curve?* Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(2): p. 256-61.
182. Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing, *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.* Nature, 1998. **391**(6663): p. 199-203.
183. Noritake, J., et al., *IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 10): p. 2085-92.

Références

184. Nowak, A.K., et al., *Systematic review of taxane-containing versus non-taxane-containing regimens for adjuvant and neoadjuvant treatment of early breast cancer.* Lancet Oncol, 2004. **5**(6): p. 372-80.
185. Oakley, B.R., *An abundance of tubulins.* Trends Cell Biol, 2000. **10**(12): p. 537-42.
186. O'Brate, A. and P. Giannakakou, *The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?* Drug Resist Updat, 2003. **6**(6): p. 313-22.
187. Ookata, K., et al., *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, 1995. **128**(5): p. 849-62.
188. Pallas, D.C., et al., *Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A.* Cell, 1990. **60**(1): p. 167-76.
189. Panda, D., et al., *Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11358-62.
190. Parvari, R., et al., *Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome.* Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 448-52.
191. Pasquier, E., et al., *Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2433-40.
192. Peterson, R.T., et al., *Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycinassociated protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4438-42.
193. Pierce, L.J., et al., *Conservative surgery and radiotherapy for stage I/II breast cancer using lung density correction: 10-year and 15-year results.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(5): p. 1317-27.
194. Pihan, G.A. and S.J. Doxsey, *The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer.* Semin Cancer Biol, 1999. **9**(4): p. 289-302.
195. Pihan, G.A., et al., *Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors.* Cancer Res, 1998. **58**(17): p. 3974-85.
196. Pourroy, B., et al., *Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest and a mitochondrial pathway.* Mol Pharmacol, 2004. **66**(3): p. 580-91.
197. Pourroy, B., et al., *Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3256-63.
198. Prigozhina, N.L., et al., *{gamma}-Tubulin Plays an Essential Role in the Coordination of Mitotic Events.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1374-1386.
199. Quaroni, A., K. Kirsch, and M.M. Weiser, *Synthesis of membrane glycoproteins in rat small-intestinal villus cells. Effect of colchicine on the redistribution of L-[1,5,6-3H]fucose-labelled membrane glycoproteins among Golgi, lateral basal and microvillus membranes.* Biochem J, 1979. **182**(1): p. 213-21.
200. Radcliffe, P., et al., *Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2-tubulin genes as fission yeast polarity mutants.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(7): p. 1757-71.

Références

201. Radcliffe, P.A. and T. Toda, *Characterisation of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B.* Mol Gen Genet, 2000. **263**(5): p. 752-60.
202. Radcliffe, P.A., L. Vardy, and T. Toda, *A conserved small GTP-binding protein Alp41 is essential for the cofactor-dependent biogenesis of microtubules in fission yeast.* FEBS Lett, 2000. **468**(1): p. 84-8.
203. Redeker, V., et al., *Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules.* Science, 1994. **266**(5191): p. 1688-91.
204. Robin, P., B. Rossignol, and M.N. Raymond, *Effect of microtubule network disturbance by nocodazole and docetaxel (Taxotere) on protein secretion in rat extraorbital lacrimal and parotid glands.* Eur J Cell Biol, 1995. **67**(3): p. 227-37.
205. Rodriguez-Boulan, E. and W.J. Nelson, *Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype.* Science, 1989. **245**(4919): p. 718-25.
206. Rodriguez-Boulan, E. and P.J. Salas, *External and internal signals for epithelial cell surface polarization.* Annu Rev Physiol, 1989. **51**: p. 741-54.
207. Rommelaere, H., et al., *Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11975-9.
208. Rosenbaum, J., *Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last.* Curr Biol, 2000. **10**(21): p. R801-3.
209. Rosette, C. and M. Karin, *Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B.* J Cell Biol, 1995. **128**(6): p. 1111-9.
210. Rouzier, R., et al., *Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8315-20.
211. Ruiz, F., et al., *The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in Paramecium, encodes a novel tubulin, eta-tubulin.* Curr Biol, 2000. **10**(22): p. 1451-4.
212. Sakorafas, G.H. and A.G. Tsiotou, *Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective.* Br J Surg, 2000. **87**(2): p. 149-62.
213. Salaycik, K.J., et al., *Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 18): p. 4113-22.
214. Salman, H., et al., *Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules.* Biophys J, 2005. **89**(3): p. 2134-45.
215. Sanchez, C., et al., *Phosphorylation and dephosphorylation in the proline-rich C-terminal domain of microtubule-associated protein 2.* Eur J Biochem, 1996. **241**(3): p. 765-71.
216. Schild, A., L.M. Ittner, and J. Gotz, *Altered phosphorylation of cytoskeletal proteins in mutant protein phosphatase 2A transgenic mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(4): p. 1171-8.
217. Schuller, E., et al., *Brain t-complex polypeptide 1 (TCP- 1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease.* Life Sci, 2001. **69**(3): p. 263-70.
218. Schwahn, U., et al., *Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2.* Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 327-32.

Références

219. Seve, P., et al., *Expression of class III {beta}-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(15): p. 5481-6.
220. Seve, P., et al., *Class III beta-tubulin is a marker of paclitaxel resistance in carcinomas of unknown primary site.* Cancer Chemother Pharmacol, 2006.
221. Sewell, J.L. and R.A. Kahn, *Sequences of the bovine and yeast ADP-ribosylation factor and comparison to other GTP-binding proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4620-4.
222. Shannon, C. and I. Smith, *Is there still a role for neoadjuvant therapy in breast cancer?* Crit Rev Oncol Hematol, 2003. **45**(1): p. 77-90.
223. Sharer, J.D., et al., *ARL2 and BART enter mitochondria and bind the adenine nucleotide transporter.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 71-83.
224. Sheeman, B., et al., *Determinants of S. cerevisiae dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning.* Curr Biol, 2003. **13**(5): p. 364-72.
225. Shern, J.F., et al., *Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A.* J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40829-36.
226. Sillje, H.H. and E.A. Nigg, *Purification of mitotic spindles from cultured human cells.* Methods, 2006. **38**(1): p. 25-8.
227. Simons, C.T., et al., *Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding.* J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4196-203.
228. Smrzka, O.W., N. Delgehyr, and M. Bornens, *Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian delta-tubulin.* Curr Biol, 2000. **10**(7): p. 413-6.
229. Sontag, E., et al., *Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies.* J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25490-8.
230. Southwood, C.M., et al., *Microtubule Deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the Nervous System.* Neurochem Res, 2006.
231. Stehbens, S.J., et al., *Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1801-11.
232. Storchova, Z. and D. Pellman, *From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 45-54.
233. Straight, A.F. and C.M. Field, *Microtubules, membranes and cytokinesis.* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R760-70.
234. Strickland, L.I., E.J. Donnelly, and D.R. Burgess, *Induction of cytokinesis is independent of precisely regulated microtubule dynamics.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4485-94.
235. Sullivan, K.F. and D.W. Cleveland, *Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4327-31.
236. Sullivan, K.F. and L. Wilson, *Developmental and biochemical analysis of chick brain tubulin heterogeneity.* J Neurochem, 1984. **42**(5): p. 1363-71.
237. Takahashi, K., E. Nakajima, and K. Suzuki, *Involvement of protein phosphatase 2A in the maintenance of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion through recruitment of IQGAP1.* J Cell Physiol, 2006. **206**(3): p. 814-20.
238. Tamkun, J.W., et al., *The arflike gene encodes an essential GTP-binding protein in Drosophila.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3120-4.

Références

239. Tar, K., et al., *Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation.* J Cell Biochem, 2004. **92**(3): p. 534-46.
240. Tar, K., et al., *Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure.* J Cell Biochem, 2006. **98**(4): p. 931-53.
241. Tassin, A.M. and M. Bornens, *Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells.* Biol Cell, 1999. **91**(4-5): p. 343-54.
242. Thazhath, R., C. Liu, and J. Gaertig, *Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in Tetrahymena.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(3): p. 256-9.
243. Thompson, T., et al., *Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53015-22.
244. Thyberg, J. and S. Moskalewski, *Role of microtubules in the organization of the Golgi complex.* Exp Cell Res, 1999. **246**(2): p. 263-79.
245. Tian, G., et al., *Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer.* J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24054-8.
246. Tian, G., et al., *Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors.* J Cell Biol, 1997. **138**(4): p. 821-32.
247. Tian, G., et al., *Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding.* J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 23910-3.
248. Tian, G., et al., *Specificity in chaperonin-mediated protein folding.* Nature, 1995. **375**(6528): p. 250-3.
249. Tournebize, R., et al., *Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis.* Embo J, 1997. **16**(18): p. 5537-49.
250. Trinczek, B., et al., *Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules.* Mol Biol Cell, 1995. **6**(12): p. 1887-902.
251. Tritarelli, A., et al., *p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3751-7.
252. Urano, N., et al., *Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer.* Int J Oncol, 2006. **28**(2): p. 375-81.
253. Vadlamudi, R.K., et al., *p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3726-36.
254. Vainberg, I.E., et al., *Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin.* Cell, 1998. **93**(5): p. 863-73.
255. Van Hoof, C. and J. Goris, *Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1640**(2-3): p. 97-104.
256. Varbiro, G., et al., *Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition.* Free Radic Biol Med, 2001. **31**(4): p. 548-58.
257. Vasiliev, J.M., *Actin cortex and microtubular system in morphogenesis: cooperation and competition.* J Cell Sci Suppl, 1987. **8**: p. 1-18.

Références

258. Vasiliev, J.M. and I.M. Gelfand, *Mechanisms of morphogenesis in cell cultures.* Int Rev Cytol, 1977. **50**: p. 159-274.
259. Vasiliev, J.M., et al., *Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts.* J Embryol Exp Morphol, 1970. **24**(3): p. 625-40.
260. Vaughan, S., et al., *New tubulins in protozoal parasites.* Curr Biol, 2000. **10**(7): p. R258-9.
261. Vega, L.R., J. Fleming, and F. Solomon, *An alpha-tubulin mutant destabilizes the heterodimer: phenotypic consequences and interactions with tubulin-binding proteins.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(9): p. 2349-60.
262. Veitia, R., et al., *Tau expression in model adenocarcinomas correlates with docetaxel sensitivity in tumour-bearing mice.* Br J Cancer, 1998. **78**(7): p. 871-7.
263. Velculescu, V.E., et al., *Characterization of the yeast transcriptome.* Cell, 1997. **88**(2): p. 243-51.
264. Verlhac, M.H., et al., *MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes.* Dev Biol, 1993. **158**(2): p. 330-40.
265. Verrills, N.M. and M. Kavallaris, *Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies.* Curr Pharm Des, 2005. **11**(13): p. 1719-33.
266. Verrills, N.M., et al., *Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia--an in vivo study.* Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1681-94.
267. Verrills, N.M., et al., *Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(19): p. 1363-74.
268. Visscher, D.W., T.L. Wallis, and J.D. Crissman, *Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics.* Cancer, 1996. **77**(2): p. 315-20.
269. Vousden, K.H. and G.F. Woude, *The ins and outs of p53.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. E178-80.
270. Wadsworth, P., *Mitosis: spindle assembly and chromosome motion.* Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(1): p. 123-8.
271. Wagner, P., et al., *Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: a novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo.* Cell Cycle, 2005. **4**(9): p. 1149-52.
272. Walden, P.D., et al., *Recognition of specific Physarum alpha-tubulin isotypes by a monoclonal antibody. Sequence heterogeneity around the acetylation site at lysine 40.* Eur J Biochem, 1989. **185**(2): p. 383-9.
273. Walker, R.A., et al., *Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies.* J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1437-48.
274. Wang, S.S., et al., *Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer.* Science, 1998. **282**(5387): p. 284-7.
275. Wang, Y., et al., *Mutations affecting beta-tubulin folding and degradation.* J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13628-35.
276. Wang, Y., et al., *Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms.* Biochemistry, 2006. **45**(1): p. 185-94.

Références

277. Waters, J.C., et al., *The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work.* Mol Biol Cell, 1996. **7**(10): p. 1547-58.
278. Webster, D.R., et al., *Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9040-4.
279. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 938-47.
280. Yoo, B.C., et al., *Expression patterns of chaperone proteins in cerebral cortex of the fetus with Down syndrome: dysregulation of T-complex protein 1.* J Neural Transm Suppl, 2001(61): p. 321-34.
281. Yu, J. and L. Zhang, *No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis.* Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 248-9.
282. Zhai, Y. and G.G. Borisy, *Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer present during the mitosis-interphase transition.* J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 4)**: p. 881-90.
283. Zhai, Y., P.J. Kronebusch, and G.G. Borisy, *Kinetochore microtubule dynamics and the metaphase-anaphase transition.* J Cell Biol, 1995. **131**(3): p. 721-34.
284. Zhai, Y., et al., *Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis.* J Cell Biol, 1996. **135**(1): p. 201-14.
285. Zhang, C.C., et al., *The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells.* Oncogene, 1998. **16**(12): p. 1617-24.
286. Zhou, C., et al., *Arl2 and Arl3 Regulate Different Microtubule-dependent Processes.* Mol Biol Cell, 2006.
287. Zuo, Z., N.M. Dean, and R.E. Honkanen, *Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest.* J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12250-8.

PARTIE IV :
ANNEXES

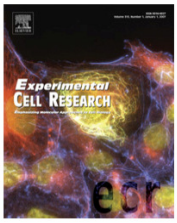
12.1. Annexe 1 : article 1

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 313 (2007) 473–485

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/yexcr



Research Article

ADP ribosylation factor like 2 (Arl2) protein influences microtubule dynamics in breast cancer cells

Anne Beghin[a,*], *Stephane Honore*[b], *Celine Messana*[a], *Eva-Laure Matera*[a], *Jennifer Aim*[a], *Sandrine Burlinchon*[a], *Diane Braguer*[b], *Charles Dumontet*[a]

[a]*Laboratoire de Cytologie Analytique, UMR INSERM 590; Université de Lyon FR69008, Lyon, France*
[b]*CNRS-FRE 2737, Université de la Méditerranée, UFR Pharmacie, 13005 Marseille, France*

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:
Received 6 June 2006
Revised version received
16 October 2006
Accepted 24 October 2006
Available online 28 October 2006

Keywords:
Arl2
Tubulin folding
Microtubule dynamics
Mitosis
Breast cancer cell

Abbreviations:
FACS, fluorescence activated cell sorter
FMA, furrow microtubule array
MA–, MCF7/Arl2–
MA+, MCF7/Arl2+
MP, MCF7/pcDNA3
MT, microtubules
NEB, nuclear envelope breakdown
NPT, nonpolymerizable soluble tubulins
PT, polymerizable soluble tubulin heterodimers

ABSTRACT

ADP ribosylation factor like 2 (Arl2) protein is involved in the folding of tubulin peptides. Variants of the human adenocarcinoma line MCF7 cells with increased or reduced content of Arl2 protein were produced and characterized. Western blot analysis performed after separation of the different fractions of tubulins showed that the content in polymerizable soluble heterodimers was significantly increased in cells with the highest Arl2 expression level (MA+) and reduced in cells with the lowest Arl2 expression level (MA–) in comparison to control cells (MP). Microtubule dynamic instability, measured after microinjection of rhodamine-labelled tubulin in living cells, was significantly enhanced in MA+ cells and reduced in MA– cells. These alterations involved modifications of the microtubule growth and shortening rates, duration of attenuation phases, percentage of time spent in each phase (growth, shortening and attenuation) and catastrophe frequency. We also observed modifications in the expression level of the tumor suppressor protein phosphatase 2Ac, which has been shown to form a complex with Arl2. Finally, cell cycle progression was modified in these cells, particularly in regard to duration of telophase. In summary, alterations in Arl2 protein content were found to be associated with modifications in tubulin pools, microtubule dynamics as well as cell cycle progression.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

* *Corresponding author*. Fax: +33 478777088.
E-mail address: anne.beghin@recherche.univ-lyon1.fr (A. Beghin).

0014-4827/$ – see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.024

Introduction

Microtubules (MT) constitute one of the major components of the cytoskeleton of eukaryotic cells and are involved in many essential processes, including cell division, cell motility and intracellular transport [1]. The basic building blocks of MT are αβ-tubulin dimers which assemble in a head-to-tail arrangement. The intrinsic molecular pattern of the αβ-tubulin repeat defines the polarity and the dynamic properties of MT. Both phenomena are important for cell cycle and division as they play critical roles in the assembly and function of the mitotic spindle and cytokinesis [2]. Understanding MT dynamics in breast cancer cells is of particular importance both in terms of tumorigenesis and drug sensitivity since taxanes, which target MT, are of major importance in this disease.

Several genetic studies suggest that ADP ribosylation factor like protein 2 (Arl2), a 21 kDa GTPase, plays a role in MT dynamics. Arl2 is a GTPase belonging to the ADP ribosylation factor (ARF) family [3–5]. Mutations of the Arl2 ortholog in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Cin4p, induce altered responsiveness to MT-directed stress (cold or benomyl) [6]. Similar results emerged from studies of *Schizosaccharomyces pombe*, in which the Arl2 ortholog, *Alp41*, was identified as an essential gene required for MT dynamics and the establishment of growth polarity [7]. Loss of function of *evl-20*, the ortholog of Arl2 in *Caenorhabditis elegans*, has been shown to cause defects in the MT cytoskeleton as well as several developmental defects [8]. In mammalian cells, Bhamidipati et al. have demonstrated direct binding between Arl2 and tubulin-binding cofactor D (TBC-D), a protein involved in tubulin folding [9,10]. TBC-D interacts with β-tubulin and contributes to the production of polymerizable tubulin heterodimers. TBC-D can also induce the dissociation of soluble αβ-tubulin heterodimers [10–13]. Binding of Arl2 to TBC-D inhibits the heterodimer-dissociating activity of TBC-D [9]. In a recent study, Zhou et al. have shown that an excess of an Arl2 mutant constitutively bound to GTP caused cell cycle arrest in M phase and the loss of microtubules due to a defect in the ability to polymerize tubulin [14]. However, the effect of Arl2 protein on MT dynamic instability has not yet been explored, in particular in mammalian cells.

These observations suggest that Arl2 may play a significant role in the determination of cellular concentrations of soluble tubulin heterodimers. In a recent study, Shern et al. described the copurification from the cytosol of a 300-kDa complex that was coenriched for the entire cytosolic pool of Arl2, TBC-D, and heterotrimeric protein phosphatase 2A (PP2A) [15]. PP2A is one of the major serine/threonine phosphatases implicated in the regulation of many cellular processes including regulation of different signal transduction pathways such as cell cycle progression [16], DNA replication [17], apoptosis [18] and is considered to be a tumor suppressor protein [17]. PP2A is also involved in dephosphorylation of MT-associated proteins such as Tau, MAP1b, MAP2 as well as that of Op18 (stathmin) [19–22], which are regulators of MT dynamics [23,24]. Given these data, changes in Arl2 levels might induce modifications in polymerization-competent αβ-tubulin heterodimer pools, thereby resulting in altered MT dynamics.

To determine the effect of Arl2 on MT dynamics in eukaryotic cells, stable variants of human breast adenocarcinoma lines (MCF7 and MDA–MB 231) were obtained and we showed that altered Arl2 protein content significantly influenced soluble tubulin pools, MT dynamics as well as cell cycle progression.

Materials and methods

Plasmid construction and stable transfection

A full-length Arl2 insert was cloned into pcDNA3 vector in order to obtain sense and antisense constructions. MCF7 cells were stably transfected with empty pcDNA3 (MCF7/pcDNA3 (MP) cells) or pcDNA3 containing sense Arl2 (MCF7/Arl2+ (MA+) cells) or antisense Arl2 (MCF7/Arl2– (MA–) cells) using Lipofectin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Similarly, transfectants were obtained from MDA–MB 231 cells, yielding MDA/Arl2+, MDA/pcDNA3 and MDA/Arl2– variants.

RNA interference

A sequence-targeting Arl2 was determined with the help of on-line search algorithms at the Qiagen (Valencia, CA) website and BLAST searches of the NCBI databases found no other human cDNAs identical to the target sequences. A scrambled siRNA (Dharmacon, Chicago, USA) was used as control. Selected siRNA sequence was submitted to a BLAST search against the human genome sequence to ensure specificity. siRNA anti-Arl2 (Qiagen, Valencia, CA) was transfected into MCF7 cells as duplexes by using Oligofectine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative real-time RT–PCR

Total mRNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative RT–PCR were performed as previously described using a LightCycler thermal cycler (Roche, Manheim, Germany) [25,26]. cDNAs were standardized using primers and probe for ribosomal 18S (Applied Biosystems, Foster City, Canada). The program used for genes of interest was denaturation at 95°C during 15 s, annealing at 58°C during 5 s and extension at 72°C during 10-s phases. Forward and reverse primer sequences used for Arl2 were 5′-GGCTCCTGACCATTCTGAAG and 3′-TGTAGTTCTGGGACCTCGTG; for PP2Ac: 5′-CCCTGGATCGTTTACAGGAA and 3′-ATGGTAAAAGTCACGTGGGT; and for TBC-D: 5′-TGTCAAGCAAAGCAAGATGT and 3′-GATACGACGGTGACAGGAG. Results were analyzed with RelQuant software (Roche, Manheim, Germany) according to the user's manual. Results are expressed in arbitrary units using the MP cell line as reference.

Total protein extraction and Western blot analysis

Protein extraction and Western blot analysis were performed as described previously [27]. Comparison between the three

lines was performed using MP as the reference (100% value) line, after standardization of β-actin values. Each experiment was performed in triplicate using the three cell lines. Antibodies against α-tubulin (DM1A clone), pan-β-tubulin (Tub 2.1 clone) and β-actin (AC-15 clone) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Antibody against the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) (1D6 clone) was purchased from Upstate (Lake Placid, USA). Polyclonal antibodies against Arl2 and against TBC-D were provided by R. Kahn (Emory University School of Medicine, Atlanta, USA) and by N. Cowan (New York University Medical Center, USA), respectively.

Separation and quantification of soluble polymerizable αβ-tubulin heterodimers, unfolded tubulins and microtubules

The method is derived from a previously assay using a specific buffer to induce tubulin polymerization [28,29]. Briefly, 20×10^6 cells were harvested, immediately resuspended in 100 μl of lysis buffer (100 mM Pipes, pH 6.7, 1 mM EGTA, and 1 mM $MgSO_4$) and lysed by one freeze–thaw cycle. Lysed cells were ultracentrifuged (100,000×*g* for 1 h at 20°C). Supernatants contained "soluble tubulins" whereas pellets contained the "microtubule" fraction. 500 μg of proteins from "soluble tubulin" fractions were incubated with 1 mM of GTP lysis buffer at 35°C for 30 min to allow tubulin polymerization, and thereafter ultracentrifuged (50,000×*g* for 45 min at 35°C). The resulting pellets contained polymerizable soluble tubulin heterodimers (PT). The resulting supernatants contained nonpolymerizable soluble tubulins (NPT). The "microtubule" fraction was resuspended in 200 μl of lysis buffer, incubated at 4°C during 45 min to induce MT depolymerization, and ultracentrifuged (50,000×*g* for 45 min at 4°C). The resulting supernatants (500 μg of proteins) underwent a cycle of polymerization in the presence of GTP, ultracentrifuged and the resulting pellets contained purified MT protein (MT). Silver stained gels of each fraction were performed following manufacturer's recommendations (Amersham Biosciences AB, Sweden). Each experiment was performed in triplicate using the three cell lines.

Microinjection of rhodamine-labeled tubulin and time-lapse microscopy of microinjected cells

Microinjection of labelled tubulin, image acquisition and dynamic measurements were performed as previously described [30]. Cells were seeded at low density one day prior to microinjection on glass coverslips. Injections were performed on a Leica DM-IRB inverted microscope using a ×40 phase objective lens using an Femtojet and micromanipulator 5171 (Eppendorf, Hamburg, Germany).

About 4 h after injection, microinjected cells were placed in RPMI culture medium lacking sodium bicarbonate, supplemented with 25 mM HEPES, 4.5 g/l glucose, 60 μl Oxyrase (Oxyrase Inc., Mansfield, USA) in a double coverslip chamber maintained at 37°C, and observed using a fluorescence microscope (Leica DM-IRB), ×100 objective lens. About 30 to 41 images per cell were acquired at 4 second intervals using a Coolsnap-FX digital camera (Princeton instruments) driven by Metamorph software (Universal Imaging, USA).

Analysis of microtubule dynamics

The positions of the plus-ends of individual MT in peripheral lamellar regions of cells were tracked over time using ImageJ® software and graphed using Microsoft® Excel spreadsheet as position versus time to generate a 'life-history plot' for each MT. Growth and shortening rates and durations were derived by regression analysis. A difference of >0.5 μm between any two consecutive points was considered as a growth or shortening event. Transitions into depolymerization or shortening are termed catastrophes, and transitions from shortening to growth or pause are called rescue. The catastrophe and rescue frequencies per unit time were calculated by dividing respectively the number of transitions from growth and pause to shortening and the number of transitions from shortening and pause to growth by the sum of the time in growth and pause. Dynamicity represents total tubulin exchange at the MT end and was calculated by dividing the sum of total length grown and shortened by the MT life span.

Protein phosphatase assay

A serine/threonine phosphatase assay system (Upstate-Millipore, USA) was used to determine the specific activities for PP2A-containing complexes, according to the manufacturer's specifications and using 300 μg of total proteins extracts for each sublines. The reaction was allowed to proceed for 15 min at 30°C. The optical density of products was determined using a plate reader to read the absorbance at 620 nm. The samples were compared with a standard curve of 0–2000 pmol of free phosphate. Results are expressed by reference to mean values obtained with MP cells lysates. Each experiment was performed in triplicate using the three cell lines.

Determination of cell proliferation rates

Cell proliferation was estimated using the methylthiazoletetrazolium (MTT) assay. Twenty thousand cells were seeded per well of a 24-well plate and incubated at 37°C. Every 24 h, MTT (500 μg/well) was added to 3 wells of each plate. After 2 h of incubation at 37°C, supernatants were removed, formazan crystals solubilized and absorbance measured as described previously [26]. Assays were performed up to 96 h.

Cell cycle distribution by flow cytometry analysis

Cells were collected and incubated at 4°C during 2 h with 1 ml of propidium iodide (0.05 mg/ml) solution contained Nonidet-P40 (0.05%). Cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgium) and Modfit LT 2.0™ software (VeritySoftware Inc, Topsham, USA).

Immunofluorescence and determination of mitotic, ana-/telophasic and cytokinetic index by confocal microscopy

Cells were fixed by incubation of 4% paraformaldehyde during 15 min and permeabilized using a PBS–Triton X-100 0.1% solution during 15 min at room temperature. Non specific sites were blocked by a PBS solution containing 3% bovine albumin,

and 1% fetal calf serum. Cells were incubated an α-tubulin primary antibody (DM1A clone, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) or a PP2Ac primary antibody (1D6 clone, Lake Placid, USA) following by a secondary FITC-antibody (Dako, Glostrup, Denmark). DNA staining was performed using diaminido-phenyl-indol (DAPI) (Roche, Manheim, Germany).

Images were obtained using a laser scanning confocal TCS Sp2 DMRXA microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) at the Centre Commun de Quantimétrie (Lyon, Université Claude Bernard, France). At least 600 cells were counted for each subline. Mitotic and ana-/telophasic indices were determined using DAPI staining. The cytokinetic index was measured using α-tubulin labeling (midbody staining).

Long time-lapse microscopy of cells

Cells were placed in DMEM culture medium maintained at 35°C, lacking sodium bicarbonate, supplemented with 35 mM HEPES, 4.5 g/l glucose and pH adjusted at 7.3 in a 24-well plate, and observed using an inverted Diavert microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France, ×6.3 objective). Images were acquired every 5 min for 15 h using a Sanyo VC-2512 camera (SANYO Scientific, Bensenville, USA) driven by Leica Q570 Quic software at the Centre Commun de Quantimétrie (Lyon, Université Claude Bernard, France). The three lines were observed in the same plate and ten complete mitoses were analyzed for each line.

Results

Arl2 protein content in stable variants and siRNA-transfected MCF7 cells

We have developed and characterized stable transfectants of the MCF7 line which have increased content (MCF7/Arl2+ (MA+) cells) or reduced content (MCF7/Arl2– (MA–) cells) of Arl2 protein. MCF7 cells transfected with the empty pcDNA3 vector (MP) cells were used as controls. Stable variants of another human breast adenocarcinoma line, MDA–MB 231, were also obtained for confirmatory experiments. Arl2 protein content was significantly decreased (–30%, $p<0.01$) in MA– cells and increased (+20%, $p<0.01$) in MA+ cells when compared to MP cells (Fig. 1a). Similar results were observed with MDA–MB 231 transfectants (data not shown). We have also performed transitory transfection of MCF7 cells using a siRNA targeting Arl2. 24 and 48 h after transfection, Arl2 protein content was shown to be significantly decreased (–30% to –60%, $p<0.05$) in comparison to cells transfected with a scrambled siRNA (Fig. 1b).

Arl2 does not modulate total tubulin content but regulates the equilibrium between soluble polymerizable αβ-tubulin heterodimers and unfolded tubulins

Immunoblotting of total cell lysates revealed no significant differences in α- and β-tubulin protein content between MP, MA– and MA+ cells (Fig. 2a).

According to the suggested role of Arl2 in the regulation of tubulin folding, we hypothesized that modifications of Arl2 expression could modify the equilibrium between the pools of soluble polymerizable αβ-heterodimers, and the non-polymerizable fraction containing tubulins complexed with different cofactors such as TBC-D. An increased Arl2

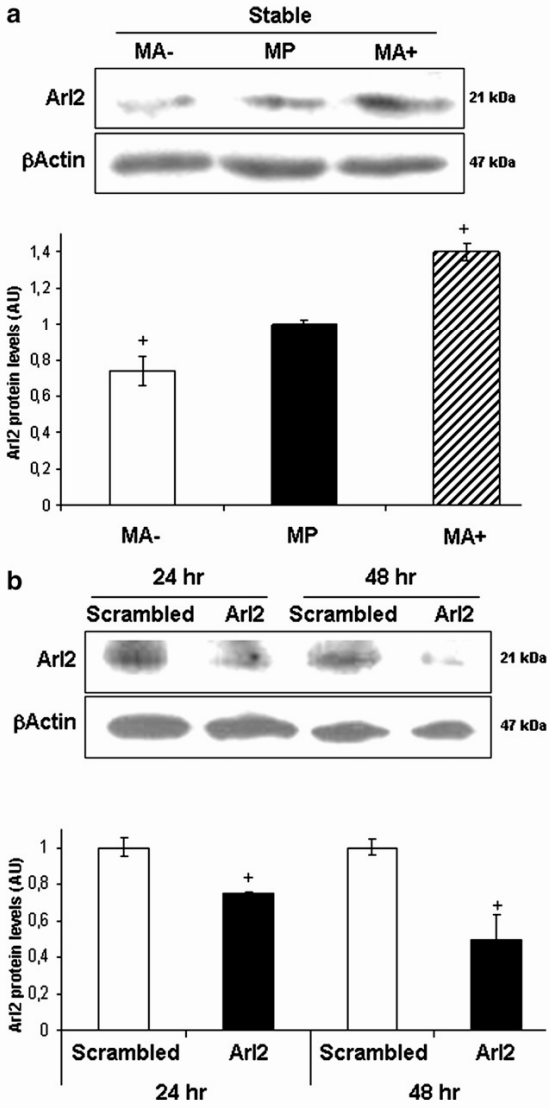


Fig. 1 – Expression of ADP ribosylation factor like protein 2 (Arl2) expression levels in transfected MCF7 cells. (a) A representative blot corresponding to Arl2 and β-actin (upper) and means of Arl2 protein ratio determined by Western blot (lower) of MCF7 cells stably transfected cells with antisense Arl2 (MA–), with empty vector pcDNA3 (MP) and with the complete coding sequence of Arl2 (MA+). (b) A representative blot corresponding to Arl2 and β-actin (upper) and means of Arl2 protein ratio determined by Western blot (lower) of MCF7 cells transiently transfected with a scrambled siRNA or with an anti Arl2 siRNA (respectively named scrambled and Arl2). Bars represent standard deviations. Data are representative of at least three independent experiments and statistical significance was determined using Student's *t* test (*$p<0.05$ between subline of interest and other sublines).

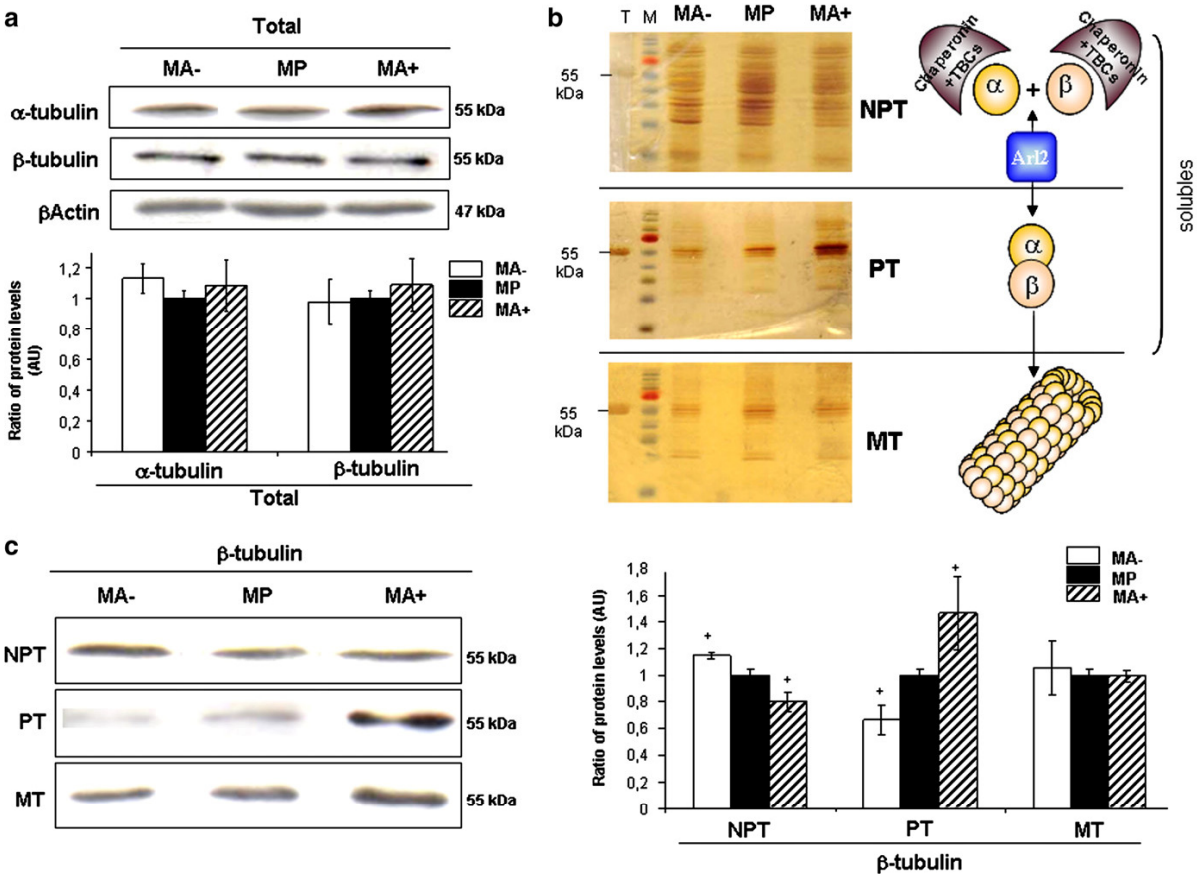


Fig. 2 – Determination of β-tubulin fractions in MA–, MP and MA+ cells. (a) Representative Western blot and means of expression levels of α- and β-tubulin levels in total extracts. (b) Representative silver-stained gel of each tubulin fraction obtained from our cell models [T: purified tubulin (Cytoskeleton Inc., USA), M: protein marker (Fermentas, Canada)] and scheme of their respective contents. Subunits of unfolded α- and β-tubulin (α and β non-polymerizable tubulin (NPT)) interact with several chaperonins and with five different tubulin-binding cofactors (TBCs) to yield their polymerization competent conformation (polymerizable tubulins (PT)) and thus be able to be incorporated into microtubules (MT). Arl2 is known to regulate the activity of at least one of the TBCs and thus could have an impact on the equilibrium between NTP and PT. (c) Representative Western blot and means of protein ratios of β-tubulin levels after separation of the soluble unpolymerizable tubulin (UPT), soluble native polymerizable tubulin (PT), and microtubule (MT) fractions. The standardization of samples was performed by adjusting total protein concentration before proceeding to polymerization and depolymerization of tubulins (see Materials and methods). Bars represent standard deviations. Data are representative of at least three independent experiments for each subline. Statistically significant differences were determined using Student's *t* test (*$p<0.05$ between subline of interest and other sublines).

protein content would be expected to induce an increase of the polymerizable tubulin heterodimer pool, while a decreased Arl2 content would induce a decrease of this fraction. Previously reported techniques used for tubulin pool separation were aimed at MT extraction [28,29] but with no consideration for the different soluble fractions of tubulins. In our procedure, we recovered the first supernatant containing all soluble tubulins, including the unpolymerizable tubulins. This supernatant was then processed to induce polymerization of tubulin (+GTP at 37°C) and centrifuged to separate tubulins which have polymerized (pellets, corresponding to the polymerizable αβ-heterodimer fraction) from the other fraction (supernatant, containing the non-polymerizable tubulins) (Fig. 2b). We measured the β-tubulin protein content in non-polymerizable tubulin (NPT), polymerizable tubulin (PT) and microtubules (MT) pools by Western blot analysis (Fig. 2c) and observed that MA– displayed a significantly higher content of NPT (+18%, $p<0.05$) and a lower PT content (–30%, $p<0.05$) when compared to MP cells. Conversely, MA+ had a significantly lower content of NPT (–22%, $p<0.05$) and a higher PT content (+45%, $p<0.05$) when compared to MP cells. No statistically significant differences were observed for MT content between the three sublines. Similar results were observed when analyzing these tubulin fractions after silver staining (Fig. 2b).

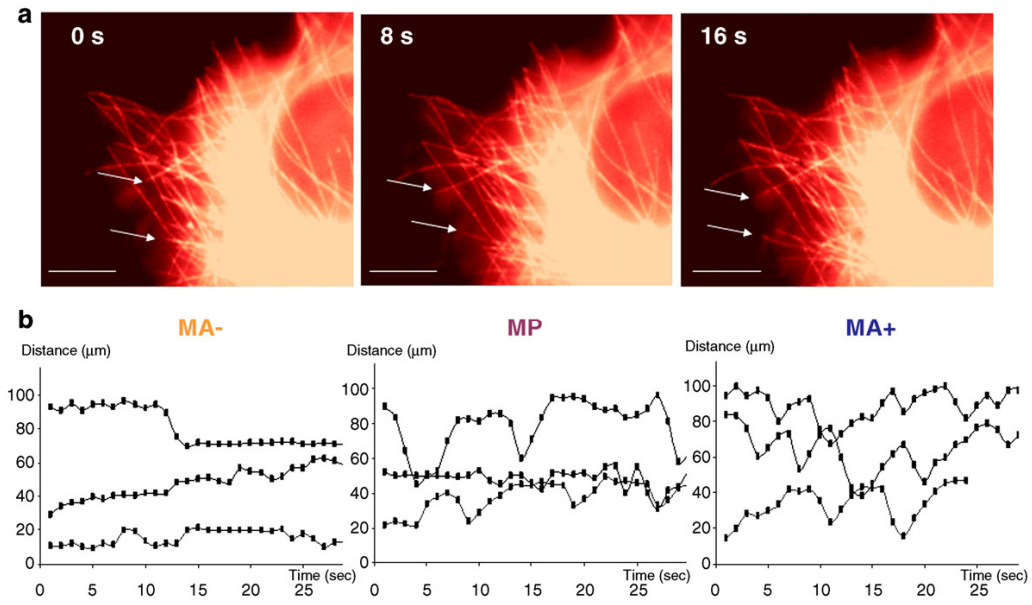


Fig. 3 – Comparison of MT dynamic behavior in MA–, MP and MA+ cells. (a) Time-lapse sequence of MT in MP cells. Scale bars represent 5 µm. (b) Life history graphs corresponding to change of length over time of three representatives MT in MA–, MP and MA+ cells.

Microtubule dynamics in living cells is modulated by Arl2 protein content

Fig. 3a shows an image gallery of the lamellar region of a living MP cell. The MT plus ends, indicated by the arrows, alternate between phases of growth, shortening, and a state of attenuated dynamic instability. The dynamic behavior of individual MT in living MP, MA– and MA+ cells is represented in Fig. 3b (called life-history plots). The life-history plots of at least 50 MT from a minimum of ten different cells were used to determine the parameters of MT dynamic instability in each cell line (Table 1).

We observed that the mean growth rate of MT was significantly higher in MA+ cells (+15%, $p<0.01$) than in MP cells, whereas this rate was decreased in MA– cells (–8%) (Table 1), resulting in a significantly lower rate (–26%, $p<0.001$) as compared to MA+. The mean shortening rate of MT was increased in MA+ cells and decreased in MA– cells when

Table 1 – Parameters of microtubule dynamic behaviors in MCF7/Arl2– (MA–), MCF7/pcDNA3 (MP) and MCF7/ARL2+ (MA+) cells

Parameters	MA–	MP	MA+	Percentages of change		
				Between MA– and MP	Between MA+ and MP	Between MA+ and MA–
Mean rate (µm min^{-1})						
Growth	10.81	11.81	13.65^{c,*}	–8.47%	15.58%	26.27%
Shortening	14.24^{+}	16.47	18.56^{c}	–13.54%	12.69%	30.34%
Mean duration (min)						
Growth	0.13**	0.19	0.17^{b}	–31.58%	–10.53%	30.77%
Shortening	0.12*	0.15	0.14	–20.00%	–6.67%	16.67%
Attenuation	0.29*	0.22	0.18^{c}	31.82%	–18.18%	–37.93%
Percentage time spent						
Growth	21.77	34.96	42.35	–37.73%	21.14%	94.53%
Shortening	15.75	20.52	23.82	–23.25%	16.08%	51.24%
Attenuation	62.48	44.52	33.82	40.34%	–24.03%	–45.87%
Transition frequency (min^{-1})						
Catastrophe	1.60	1.77	2.29^{a}	–9.60%	29.38%	43.13%
Rescue	7.43	5.98	6.86^{b}	24.25%	14.73%	–7.66%
Dynamicity (µm min^{-1})	4.60	7.51	10.20	–38.75%	35.82%	121.74%

Parameters were calculated on at least 50 different MT belonging to at least 10 different cells in MA–, MP and MA+ models.
Statistical significance was determined using Student's t test ($^{+}p<0.05$, $^{*}p<0.01$, $^{**}p<0.001$ between MA– or MA+ and MP; $^{a}p<0.05$, $^{b}p<0.01$, $^{c}p<0.001$ between MA– and MA+).

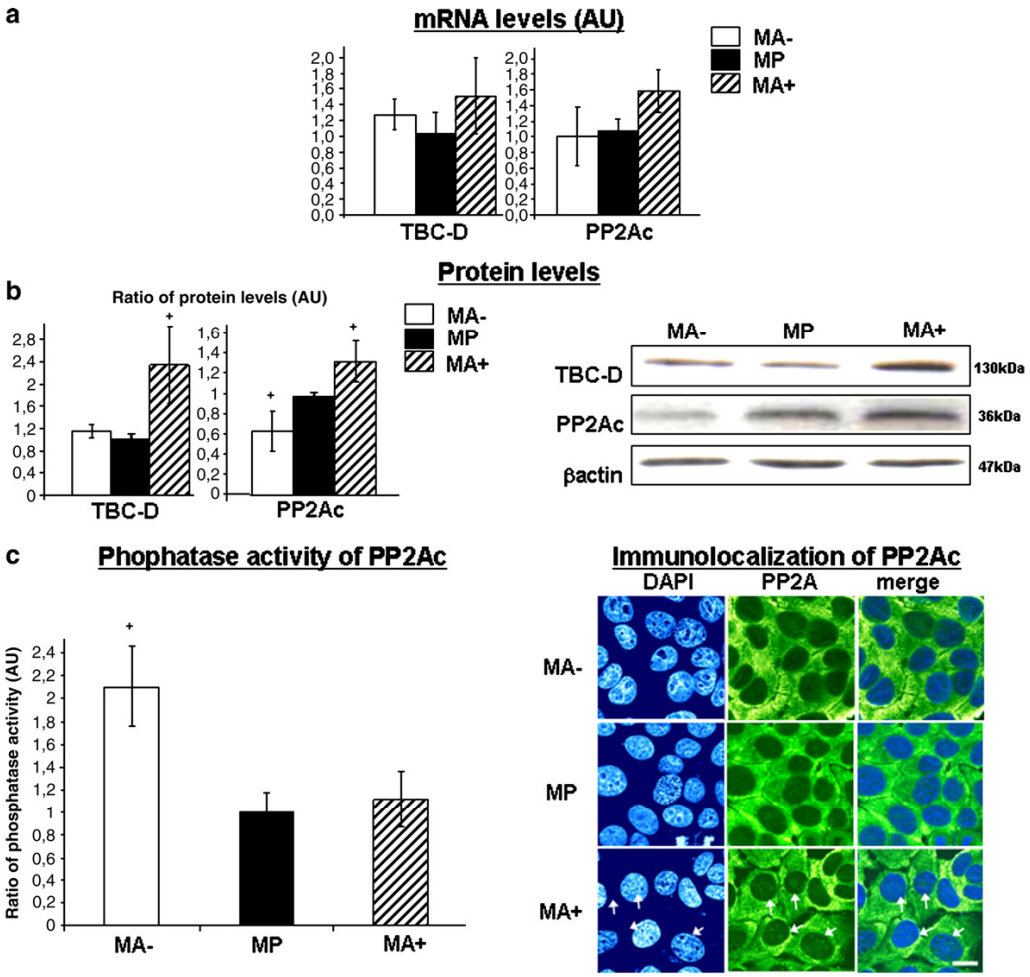


Fig. 4 – Determination of tubulin binding cofactor D (TBC-D) and of catalytic subunit protein phosphatase 2A (PP2Ac) expression levels in MA–, MP and MA+ cells. (a) Means of expression levels of TBC-D and PP2Ac ARNm determined by quantitative real-time RT–PCR expressed in arbitrary units (AU). (b) Means of protein ratio (left) corresponding to TBC-D and PP2Ac in total protein extracts expressed in arbitrary units (AU) and a representative Western blot (right). Bars represent standard deviations. (c) Means of ratio of PP2Ac phosphatase activity in total protein extracts expressed in arbitrary units (AU) (left) and representative images of each subline after DNA (DAPI, blue) and PP2Ac (PP2Ac, green) staining (right). Bars represent standard deviations. Scale bars represent 15 μm, white arrows indicate nucleolar localization of PP2Ac (observed only in MA+ cells). Data are representative of at least three independent experiments for each subline. Statistical significance was determined using Student's *t* test (*$p<0.05$ between subline of interest and other sublines).

compared to MP cells. This also represented a significant increase (+30%, $p<0.001$) between MA– and MA+ cells (Table 1).

No significant differences were observed in the mean duration of each phase (growth, shortening and attenuation) in MA+ and MP cells (Table 1). Nevertheless, in term of percentages of time spent in each phase, MT in MA+ cells spent less time in pause than those in MP cells (–24%). This was accompanied by a correspondingly greater fraction of time spent in growing or shortening (Table 1). The mean duration of shortening and growth phases in MA– cells were significantly decreased compared to MP cells. Conversely, the mean duration of the attenuation phase was significantly (+32%, $p<0.01$) longer in MA– cells in comparison to MP cells. These differences were also seen in percentages of time spent in each phase with an increase of 40% of time spent in attenuation phase for MT in MA– cells compared to those of MP cells (Table 1).

Rescue and catastrophe frequencies per minute were not significantly different between MT of MP cells and those of in MA– cells or MA+ cells (Table 1). Nevertheless, a significant increase in catastrophe frequencies (+43%, $p<0.05$) was observed between MT in MA+ and MA– cells (Table 1). Overall, MT dynamicity was increased by 36% in MA+ cells and decreased by 39% in MA– cells as compared to that calculated for MP cells which represented a difference of 122% between MA– and MA+ (Table 1).

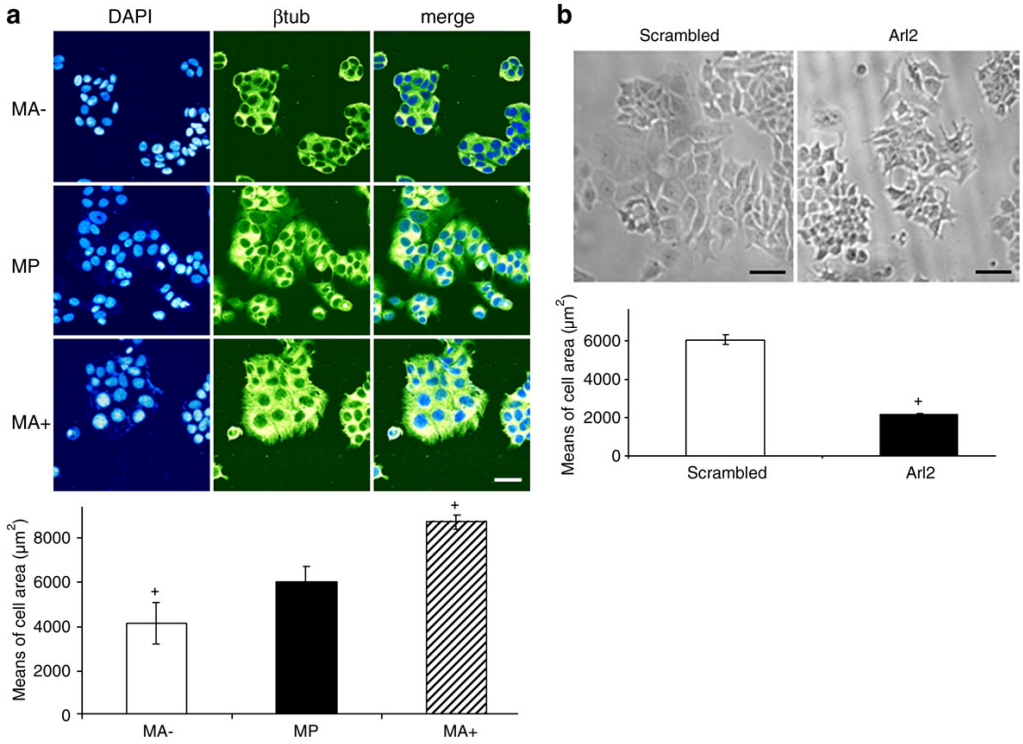


Fig. 5 – Morphological analysis of cellular models MA–, MP and MA+ and of MCF7 cells transiently transfected with a scrambled siRNA or with an anti Arl2 siRNA. (a) Representative images of each subline after DNA (DAPI, blue) and β-tubulin (βtub, green) staining and means of cell area (μm²) were evaluated by confocal microscopy for 200 cells in at least three different images. Scale bars represent 30 μm. Bars represent standard deviations. (b) Representative images of MCF7 cells 48 h after transfection with scrambled or with an anti-Arl2 siRNA (respectively named scrambled and Arl2) and means of cells area (μm²) were evaluated by microscopy for 200 cells in at least three different images. Scale bars represent 30 μm. Bars represent standard deviations. Data are representative of at least three independent experiments and statistical significance was determined using Student's *t* test (*$p<0.05$ between subline of interest and other sublines).

These results indicate that the growth and shortening rates, the percentage of time spent in growth or shortening, the catastrophe frequency and the overall MT dynamicity were positively associated with Arl2 protein content. In contrast, the mean duration of pause and the percentage of time spent in pause were negatively associated with Arl2 protein content.

Arl2 regulates the content of TBC-D and the content, localization and activity of PP2Ac

As shown by quantitative real-time RT–PCR, no differences were observed in TBC-D and PP2Ac mRNA levels between MP, MA+ and MA– cells (Fig. 4a). Conversely, TBC-D protein content was significantly greater (+130%, $p<0.05$) in MA+ cells than in MP cells (Fig. 4b). Western blot analysis performed on the different tubulin fractions (NPT, PT, MT) showed that TBC-D was only detectable in the non-polymerizable fraction (data not shown). PP2Ac protein levels in MA+ cells were also significantly greater (+35%, $p<0.05$), and significantly lower (−34%, $p<0.05$) in MA– cells than in MP cells (Fig. 4b). Similar results were observed with MDA–MB 231 transfectants (data not shown). As PP2A is at least partly bound to MT [31], we have performed Western blot analysis using antibody directed against PP2Ac on the different tubulin fractions (NPT, PT, MT). Interestingly, no differences were observed in the distribution of PP2Ac in the MA–, MP and MA+ lines (data not shown). These results suggest that Arl2 influences PP2Ac and TBC-D content by a translational or post-translational mechanism that could be MT-independent.

To determine the impact of Arl2 content on PP2A activity and localization, we have assayed the threonine dephosphorylating activity of PP2Ac in our cell lines. The assay used here to test PP2Ac activity is based on immunoprecipitation of PP2Ac. We have followed the manufacturer's instructions and immunoprecipitated identical total protein amounts for the three sublines. We have observed a twofold higher PP2A activity ($p<0.05$) in the MA– extract as compared to MP and MA+ extracts (Fig. 4c). In parallel with activity assays, we have performed Western blot analyses of PP2Ac immunoprecipitated proteins and we have observed no differences in the amount of immunoprecipitated PP2Ac (data not shown). Consequently, the specific activities of PP2Ac appear to differ between cell lines. This could be due to binding

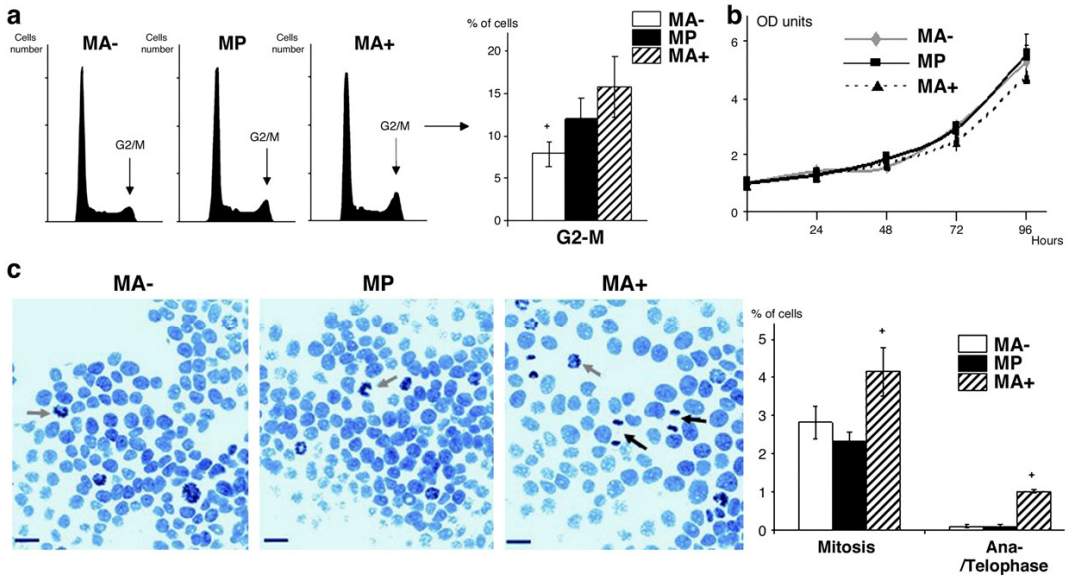


Fig. 6 – Cell cycle distribution, ana-/telophasic index and proliferation rates mitotic of MA–, MP and MA+ cells. (a) MA–, MP and MA+ cell distributions in G0/G1, S, and G2-M phases evaluated by flow cytometry (left: representative distribution plots, right: means of percentages of cells in G2-M phases). (b) Means of proliferation rates of MA–, MP and MA+ cells evaluated by MTT assay expressed in optic density units (OD units) per hour. (c) MA–, MP and MA+ mitotic and anaphase/telophase indices evaluated by confocal microscopy of 600 cells in at least three different images (left: representative images; right: means of mitotic and telophase cell percentages). Scale bars represent 20 μm, black arrows indicate telophasic cells and grey arrows pro- and metaphasic cells. Bars represented standard deviations. All assays were performed in triplicate in at least three separate experiments. Statistical significance was determined using Student's *t* test (*$p<0.05$ between subline of interest and other sublines).

partners of PP2Ac such Arl2 and TBC-D. Furthermore, we have performed immunolocalization of PP2Ac in the different sublines (Fig. 4c). PP2Ac appeared to be mainly cytoplasmic in MA–, MP and MA+ cells. Nevertheless, we have observed for the MA+ cells a low but detectable signal of PP2Ac in nucleolus, which is not detectable in MP and MA+ cells (white arrow, Fig. 4c). This result suggests that Arl2 could influence the localization and the nucleolar addressing of PP2A.

Arl2 expression level modifies cell morphology

As a consequence of microtubular cytoskeleton perturbation, cellular morphology has been investigated by immunocytochemistry using anti-β-tubulin–FITC and DAPI staining (Fig. 5a). Similar results were obtained using anti-α-tubulin antibody (data not shown). After analysis by ImageJ software, MA+ occupied 20% to 25% more surface than MP cells ($p<0.05$). Furthermore, MA– cells occupied 25% to 30% ($p<0.05$) less surface than MP cells. These results were confirmed under different confluence conditions and with MDA–MB 231 transfectants (data not shown). Similarly, 48 h after transfection with siRNA targeting Arl2, we also observed a significant decrease of cell spreading (−60%, $p<0.05$) in comparison with scrambled siRNA-transfected cells (Fig. 5b). Thus transient inhibition of Arl2 protein content induced rapid modifications of cell morphology. Arl2 protein content is correlated with the cell spreading of these breast cancer cell lines.

Arl2 protein content influences mitotic and cytokinetic progression

Integrity of MT dynamics is a prerequisite to achieve normal mitosis. We therefore investigated cell cycle distribution in exponentially growing MA–, MP and MA+ cells by flow cytometry analysis (Fig. 6a). We observed that MA– had a significant lower percentage of cells in G2/M phase (7.8%) as compared to MP cells (12%) while MA+ cells displayed an increase of this fraction (15.8%). As no differences were observed in proliferation rates between the three sublines (Fig. 6b), these data suggested that MA– cells might undergo a faster G2-M transition and spend less time in G2 phase than MP cells. Conversely MA+ cells would be expected to undergo a slower G2/M transition.

To determine whether there were differences in the duration of mitosis between the three lines, mitotic indices and evaluation of anaphase/telophase and cytokinetic fractions were measured. Furthermore, FACS assay required relatively aggressive manipulations for adherents cells that probably involved dissociation of some cytokinetic cells as these cells are only bonded by a thin cellular expansion. Mitotic and ana-/telophasic index were determined using DAPI staining (Fig. 6c). We observed a significantly larger fraction ($p<0.05$) of mitotic cells in the MA+ (4.2%) population than in the MA– (2.7%) and MP (2.4%) population. Evaluation of the percentage of cells in anaphase/telophase showed a

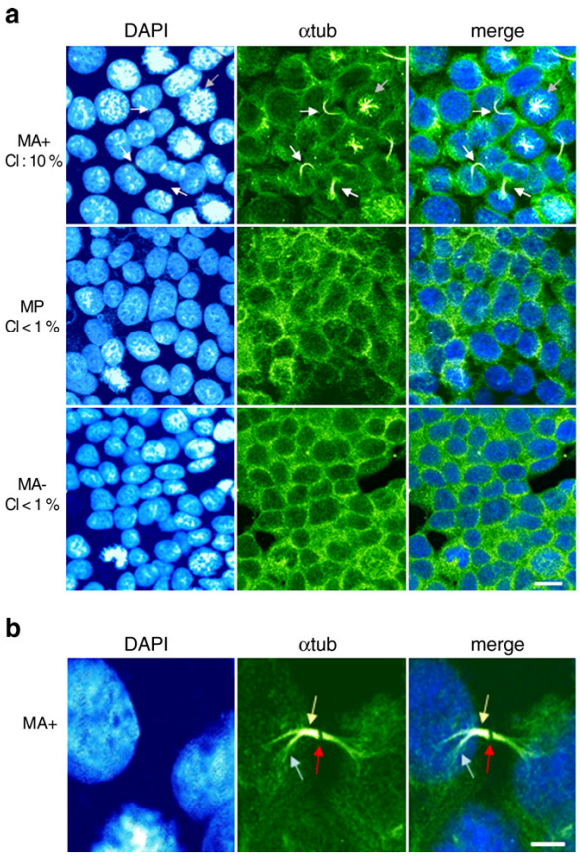


Fig. 7 – Cytokinetic index (CI) of MA–, MP and MA+ cells. (a) Representative images of each subline after DNA (DAPI, blue) and α-tubulin (αtub, green) staining. Mean cytokinetic indices (CI) were evaluated by confocal microscopy of 600 cells in at least three different images. Scale bars represent 10 μm, white arrows indicate cytokinetic cells and grey arrows mitotic cells. (b) Zoom of MA+ cells in cytokinesis. The light blue arrow indicates furrow microtubule array, the yellow arrow indicates midbody microtubules and the red arrow shows the actomyosin contractile ring (lack of labeling in the middle of midbody microtubules). Scale bars represent 5 μm.

significantly ($p<0.05$) higher percentage of MA+ cells (1%) in anaphase/telophase while MP and MA– cells had similar fractions (0.1%) (Fig. 6c). As cells in cytokinesis were not detectable using only DAPI staining, we used a α-tubulin antibody to detect the end of cytokinesis (Fig. 7) marked by the appearance of a specific thin cytoplasmic microtubule-enriched bridge (midbody microtubules and furrow microtubule array) with a ring lacking tubulin in the middle corresponding to the actomyosin contractile ring. We found a significantly ($p<0.05$) higher percentage of cytokinetic cells (12%) in the MA+ subline, as compared to 1% in the other sublines.

To evaluate times spent in each phase of mitosis, we performed long time-lapse microscopy at regulated temperature (Fig. 8a). Only mitoses that were complete during the observation period (15 h) were taken into account. No significant differences were observed in the total duration of complete mitosis between the three cell lines (Fig. 8b). Nevertheless, we observed some aborted and telophase/cytokinesis-blocked mitosis for MA+ cells but not for MP or MA– cells (data not shown). These cells were not measured for the evaluation of total duration of mitosis but are present in G2/M phase percentages measured by the flow cytometry experiment. Furthermore, we observed a significant decrease (–40 min, $p<0.05$) of time spent in pro- and metaphase for MA+ cells as compared to MP and MA– cells (Fig. 8c). As expected, we also observed a corresponding increase (+50 min, $p<0.05$) of anaphase/telophase duration in MA+ cells as compared to MP and a decrease (–15 min, $p<0.05$) of duration of these phases in MA– cells as compared to the other cell lines. Similar differences were observed in transfectants derived from MDA-MB 231 cells. MDA/Arl2+ cells displayed decrease of time spent in pro- and metaphase and prolonged telophase in comparison to MDA/pcDNA3 cells (data not shown).

These data suggest that Arl2 content induces significant alterations in mitotic progression. Increased Arl2 content was associated with a decreased duration of prometaphase or metaphase, a prolonged telophase and aborted mitosis while decreased Arl2 content was associated with shorter telophase.

Discussion

In this work, we have shown that Arl2 protein content, which is involved in tubulin folding, drastically influences cell morphology (or cell spreading), soluble tubulin pools, MT dynamics and cell cycle progression in two different breast cancer cell lines.

Arl2–GDP has been shown to bind to TBC-D, a major cofactor of β-tubulin folding and of αβ dimer dissociation. When TBC-D is overexpressed, leading to disruption of tubulin dimers, GDP-bound Arl2 salvages the microtubular cytoskeleton [9]. In the same way, we have showed that weak variations in Arl2 protein have significant consequences on soluble tubulin pools. This correlation could be due to the impact of Arl2 on TBC-D activity described previously. We also found a correlation between the contents of Arl2 and TBC-D proteins. Shern et al. have described the complex formed by Arl2, TBC-D and PP2A and reported that the relative amounts of each protein in this complex are uncertain. The size of the complex is approximately 270–300 kDa, which can correspond to one molecule of PP2A, one molecule of TBC-D and one molecule of Arl2, or to two molecule of TBC-D associated to one molecule of Arl2. We suggest that there might be a mixture of several types of complexes that could explain the high increase of TBC-D content in MA+ cells.

Zhou et al. previously showed that expression of an Arl2 mutant bound to GTP (inactive GTPase mutant) caused a loss of microtubules and cell cycle arrest in M phase [14]. We have overexpressed a wild type form of Arl2 that can potentially bind to and hydrolyse GTP. Consequently, part of our results

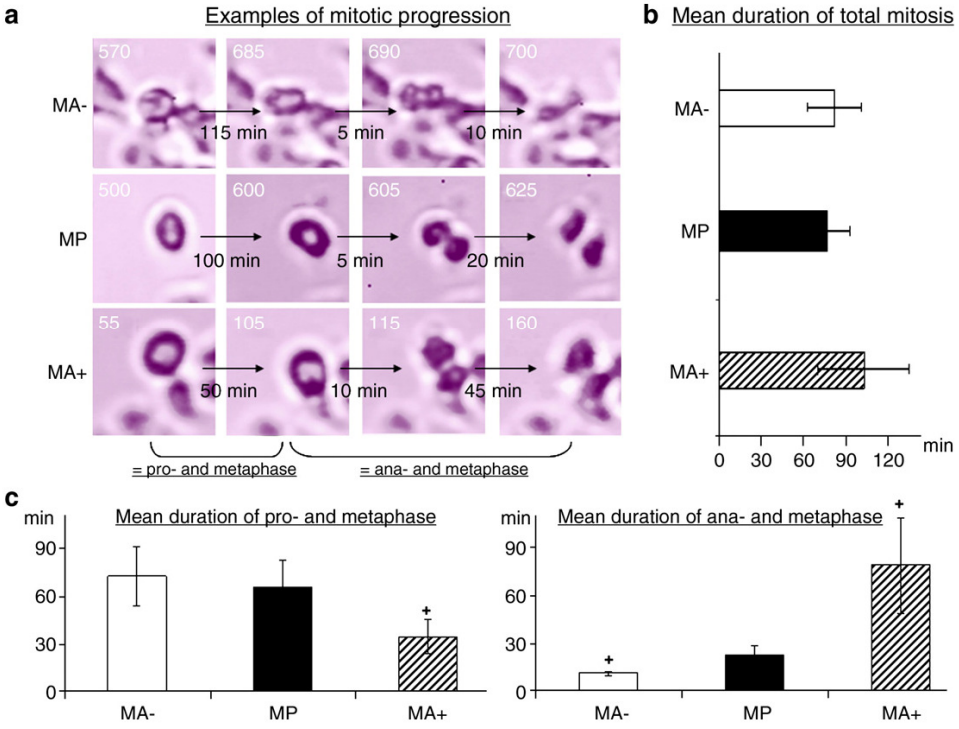


Fig. 8 – Mitotic progression of MA–, MP and MA+ cells. (a) Representative images and corresponding durations of mitotic progression of MA–, MP and MA+; first column: beginning of prophase, second column: beginning of anaphase, third column: beginning of telophase and cytokinesis, fourth column: end of mitosis (cellular re-adhesion). (b) Means of total mitotic duration of MA–, MP, MA+ in minutes. (c) Means of prophase and metaphase duration (left) and of anaphase/telophase duration (right) of MA–, MP, MA+ in minutes. Bars represent standard deviations. Statistical significances were determined using Student's *t* test ($^{+}p<0.05$ between subline of interest and other sublines).

could be due to the same mechanism underlying Zhou's results (Arl2–GTP). Furthermore, as Arl2 and Arl3 are closely related proteins sharing the same binding partners [32] and Arl3 influences cell morphology and tubulin post-translational modifications [14], we cannot exclude that the alterations found in our cells involve an Arl3-dependent pathway. Nevertheless, we have evaluated Arl3 mRNA expression level using quantitative polymerase chain reaction assay and we have found no differences between MA–, MP and MA+ cells.

We have shown that changes in Arl2 protein content results in important modifications in MT dynamics. MT dynamic instability parameters such as polymerization, length of growing phase, percentage of time spent in shortening and catastrophe frequency are dependent on polymerizable tubulin heterodimer concentration [33,34] and we observed modifications of these parameters in our models in correlation with modifications of polymerizable tubulin heterodimer concentration. However, the catastrophe frequency and the shortening rate, which we found to be altered in our sublines, have not been shown to be dependent on polymerizable tubulin heterodimer pools. This might be explained by altered levels, activity and/or localization of PP2A in cells with different Arl2 protein content. PP2A is an important phosphatase regulating proteins involved in tubulin sequestration or polymerization, such as Tau, MAP1, MAP2 and Op18, proteins which have been shown to be expressed in breast cancer cells [22,35–38]. We have demonstrated that Arl2 can influence the content, the activity and the nucleolar addressing of the catalytic subunit of PP2A (PP2Ac), suggesting that Arl2 could behave as a regulatory subunit of PP2A by determining the localization of PP2A. Our hypothesis is that PP2A complexed to Arl2 could be less active than PP2A alone, which would be in agreement with the results of Shern et al. [15]. We measured PP2A activity using a 6-amino-acid phosphopeptide. Activity and affinity of PP2A and PP2A–Arl2 for specific proteins has not yet been evaluated.

Using siRNA transfection, we have observed morphological modifications similar to those obtained with stable antisense transfection. It is now well established that the cell cytoskeleton influences cell morphology and our results suggest that the alterations in morphology are a consequence of the MT alterations observed. Furthermore, these results suggest that the observations made in the stably transfected models are directly correlated with Arl2 expression levels. These results are in contrast to those of Zhou et al. who have found no significant morphological alterations after modifications of Arl2 expression level in HeLa cells

[14]. As HeLa cells are quite elongated in comparison to MCF7 cells, it could have been quite difficult to detect precise morphological changes induced by Arl2 depletion in these cells.

In HeLa cells, Zhou et al. have shown that Arl2 is bound to centrosomes throughout the cell cycle and is thus available to participate in the growth and regulation of both interphase microtubules and the mitotic spindle microtubules. Our results have shown that cells with increased Arl2 content displayed a shorter pro- and metaphase and a protracted anaphase/telophase, leading in some instances to mitotic abortion. As the total length of mitosis is similar, irrespective of Arl2 protein content, it seems counterintuitive that there would be differences in the percentages of cells in G2/M as shown by FACS. One possible explanation is the alteration of MT dynamics. At the transition between G2 phase and prophase, a large decrease in MT polymer is observed upon nuclear envelope breakdown. As MA– cells have a lower content of polymerizable tubulin heterodimers, it is possible that these cells could undergo a large decrease of MT polymer mass more rapidly than cells with larger pools of Arl2 protein and of polymerizable tubulin. This would resulted in a shorter G2 phase, corresponding to the differences observed by flow cytometry, but not seen in the DAPI staining and in the time lapse assay which do not take account the G2 phase. The requirement of high MT dynamicity for correct alignment and segregation of chromosome at metaphase–anaphase is illustrated in MA+ cells which have the highest MT dynamicity and the shortest metaphase–anaphase transition. Finally, it has been previously shown that induction of cytokinesis seems to be independent of precisely regulated microtubule dynamics [39] and requires separation of the midbody by an actomyosin ring. As MA+ contain more polymerizable tubulin heterodimers and since specialized microtubule structures (furrow microtubule array) are responsible for directing membrane vesicles to the site of cell cleavage [40], these cells could either have a greater mass of midbody microtubules and/or have membrane incorporation alterations rendering the contraction of the actomyosin ring more difficult and thus inducing telophase blockage and mitotic abortion. An alternative hypothesis is that cells with different PP2A activity have different contents of active (dephosphorylated) Op18/stathmin, a regulator of the prophase–metaphase transition.

Major progress has been made in the understanding of MT dynamics and its regulatory processes. Most efforts have been focused on tubulin-interacting proteins such as MAPs or Op18. Nevertheless, little is known about the importance of tubulin binding cofactors and their regulators on tubulin pools and MT dynamics. Our results obtained in human adenocarcinoma cell lines suggest that early processes in tubulin peptide folding play a key role in the regulation of the microtubular cytoskeleton. These results emphasize the importance of events upstream of tubulin polymerization on cytoskeletal function. Studies analyzing the clinical relevance of these observations in breast cancer samples will be extremely interesting to determine the usefulness of Arl2 as a prognostic factor or as a therapeutic target in breast cancer.

Acknowledgments

We thank Dr Richard Kahn for Arl2 antibody, Dr Lars Jordheim and Dr Carlos Galmarini for technical suggestions and helpful discussions. This work was supported in part by the Association pour la Recherche contre le Cancer, by the Comité de la Saône-et-Loire and Comité de la Loire de la Ligue Contre le Cancer and by the Cancéropole Provence-Alpes-Côte d'Azur.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.024.

REFERENCES

[1] S. Honore, E. Pasquier, D. Braguer, Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 3039–3056.
[2] R.L. Margolis, L. Wilson, Microtubule treadmilling: what goes around comes around, Bioessays 20 (1998) 830–836.
[3] R.A. Kahn, J. Cherfils, M. Elias, R.C. Lovering, S. Munro, A. Schurmann, Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins, J. Cell Biol. 172 (2006) 645–650.
[4] R.A. Kahn, F.G. Kern, J. Clark, E.P. Gelmann, C. Rulka, Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins, J. Biol. Chem. 266 (1991) 2606–2614.
[5] R.A. Kahn, L. Volpicelli-Daley, B. Bowzard, P. Shrivastava-Ranjan, Y. Li, C. Zhou, L. Cunningham, Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics, Biochem. Soc. Trans. 33 (2005) 1269–1272.
[6] M.A. Hoyt, J.P. Macke, B.T. Roberts, J.R. Geiser, *Saccharomyces cerevisiae* PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability, Genetics 146 (1997) 849–857.
[7] P.A. Radcliffe, L. Vardy, T. Toda, A conserved small GTP-binding protein Alp41 is essential for the cofactor-dependent biogenesis of microtubules in fission yeast, FEBS Lett. 468 (2000) 84–88.
[8] I. Antoshechkin, M. Han, The *C. elegans evl-20* gene is a homolog of the small GTPase ARL2 and regulates cytoskeleton dynamics during cytokinesis and morphogenesis, Dev. Cell 2 (2002) 579–591.
[9] A. Bhamidipati, S.A. Lewis, N.J. Cowan, ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin, J. Cell Biol. 149 (2000) 1087–1096.
[10] G. Tian, S.A. Lewis, B. Feierbach, T. Stearns, H. Rommelaere, C. Ampe, N.J. Cowan, Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors, J. Cell Biol. 138 (1997) 821–832.
[11] G. Tian, I.E. Vainberg, W.D. Tap, S.A. Lewis, N.J. Cowan, Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding, J. Biol. Chem. 270 (1995) 23910–23913.
[12] G. Tian, A. Bhamidipati, N.J. Cowan, S.A. Lewis, Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer, J. Biol. Chem. 274 (1999) 24054–24058.
[13] M. Lopez-Fanarraga, J. Avila, A. Guasch, M. Coll, J.C. Zabala, Review: Postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics, J. Struct. Biol. 135 (2001) 219–229.

[14] G. Zhou, L. Cunningham, A.I. Marcus, Y. Li, R.A. Kahn, Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes, Mol. Biol. Cell (2006).
[15] J.F. Shern, J.D. Sharer, D.C. Pallas, F. Bartolini, N.J. Cowan, M.S. Reed, J. Pohl, R.A. Kahn, Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A, J. Biol. Chem. 278 (2003) 40829–40836.
[16] J. Minshull, A. Straight, A.D. Rudner, A.F. Dernburg, A. Belmont, A.W. Murray, Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast, Curr. Biol. 6 (1996) 1609–1620.
[17] V. Janssens, J. Goris, C. Van Hoof, PP2A: the expected tumor suppressor, Curr. Opin. Genet. Dev. 15 (2005) 34–41.
[18] C. Van Hoof, J. Goris, Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question, Biochim. Biophys. Acta 1640 (2003) 97–104.
[19] G. Kreitzer, G. Liao, G.G. Gundersen, Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism, Mol. Biol. Cell 10 (1999) 1105–1118.
[20] M. Bennecib, C.X. Gong, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain, FEBS Lett. 485 (2000) 87–93.
[21] C.X. Gong, J. Wegiel, T. Lidsky, L. Zuck, J. Avila, H.M. Wisniewski, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Regulation of phosphorylation of neuronal microtubule-associated proteins MAP1b and MAP2 by protein phosphatase-2A and -2B in rat brain, Brain Res. 853 (2000) 299–309.
[22] R. Tournebize, S.S. Andersen, F. Verde, M. Doree, E. Karsenti, A.A. Hyman, Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis, EMBO J. 16 (1997) 5537–5549.
[23] S.S. Andersen, Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18, Trends Cell Biol. 10 (2000) 261–267.
[24] P. Holmfeldt, N. Larsson, B. Segerman, B. Howell, J. Morabito, L. Cassimeris, M. Gullberg, The catastrophe-promoting activity of ectopic Op18/stathmin is required for disruption of mitotic spindles but not interphase microtubules, Mol. Biol. Cell 12 (2001) 73–83.
[25] C.M. Galmarini, M.L. Clarke, N. Falette, A. Puisieux, J.R. Mackey, C. Dumontet, Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine, Int. J. Cancer 97 (2002) 439–445.
[26] L.P. Jordheim, E. Cros, M.H. Gouy, C.M. Galmarini, S. Peyrottes, J. Mackey, C. Perigaud, C. Dumontet, Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug, Clin. Cancer Res. 10 (2004) 5614–5621.
[27] C.M. Galmarini, N. Falette, E. Tabone, C. Levrat, R. Britten, N. Voorzanger-Rousselot, O. Roesch-Gateau, A. Vanier-Viornery, A. Puisieux, C. Dumontet, Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity, Br. J. Cancer 85 (2001) 902–908.
[28] H.H. Sillje, E.A. Nigg, Purification of mitotic spindles from cultured human cells, Methods 38 (2006) 25–28.
[29] C.N. Newton, J.G. DeLuca, R.H. Himes, H.P. Miller, M.A. Jordan, L. Wilson, Intrinsically slow dynamic instability of HeLa cell microtubules in vitro, J. Biol. Chem. 277 (2002) 42456–42462.
[30] E. Pasquier, S. Honore, B. Pourroy, M.A. Jordan, M. Lehmann, C. Briand, D. Braguer, Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells, Cancer Res. 65 (2005) 2433–2440.
[31] K. Tar, A.A. Birukova, C. Csortos, E. Bako, J.G. Garcia, A.D. Verin, Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation, J. Cell. Biochem. 92 (2004) 534–546.
[32] M. Hanzal-Bayer, L. Renault, P. Roversi, A. Wittinghofer, R.C. Hillig, The complex of Arl2–GTP and PDE delta: from structure to function, EMBO J. 21 (2002) 2095–2106.
[33] R.A. Walker, E.T. O'Brien, N.K. Pryer, M.F. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, E.D. Salmon, Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies, J. Cell Biol. 107 (1988) 1437–1448.
[34] D. Chretien, S.D. Fuller, E. Karsenti, Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates, J. Cell Biol. 129 (1995) 1311–1328.
[35] P. Wagner, B. Wang, E. Clark, H. Lee, R. Rouzier, L. Pusztai, Microtubule associated protein (MAP)-Tau: a novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo, Cell Cycle 4 (2005) 1149–1152.
[36] R. Veitia, M.C. Bissery, C. Martinez, A. Fellous, Tau expression in model adenocarcinomas correlates with docetaxel sensitivity in tumour-bearing mice, Br. J. Cancer 78 (1998) 871–877.
[37] R. Rouzier, 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, L. Pusztai, Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 8315–8320.
[38] K. Mimori, N. Sadanaga, Y. Yoshikawa, K. Ishikawa, M. Hashimoto, F. Tanaka, A. Sasaki, H. Inoue, K. Sugimachi, M. Mori, Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful paclitaxel treatment, Br. J. Cancer 94 (2006) 1894–1897.
[39] L.I. Strickland, E.J. Donnelly, D.R. Burgess, Induction of cytokinesis is independent of precisely regulated microtubule dynamics, Mol. Biol. Cell 16 (2005) 4485–4494.
[40] A.F. Straight, C.M. Field, Microtubules, membranes and cytokinesis, Curr. Biol. 10 (2000) R760–R770.

12.2. Annexe 2 : article 2

Soumis à *Oncogene* le 21/12/2006

Title: Arl2 content is associated with p53 localization and chemosensitivity in a breast cancer cell line.

Authors: Anne Beghin1,*, EvaLaure Matera1, Charles Dumontet1,2

Affiliations:
Laboratoire de Cytologie Analytique, UMR INSERM 590; Université de Lyon FR69008, Lyon (France) ; 2 Hospices Civils de Lyon
* corresponding author : Tel : (+33) 478777236
Fax : (+33) 478777088 Mail : beghinanne@yahoo.fr
Running title: Arl2 and chemosensitivity in breast cancer
Keywords : breast cancer, chemosensitivity, Arl2, p53

Abstract
In mammalian cells, ADP ribosylation factor like 2 (Arl2) has been shown to form a complex with tubulin binding cofactor D (TBC-D) and the tumor suppressor protein phosphatase 2A (PP2A). We have previously shown that alterations in Arl2 protein content were associated with modifications in PP2Ac protein content in breast cancer cells. Here, we show in MCF7 derived models that Arl2 expression levels influence sensitivity to various anticancer compounds such as taxol, navelbine and gemcitabine. We hypothesized that modifications of Arl2 expression levels could result in an altered phosphorylation status and/or cellular sublocalization of certain PP2A targets such as p53, a key mediator of chemotherapy-induced apoptosis. A decreased level of Arl2 expression was associated with an increase of ser 15-p53, a form which was found to be preferentially bound to microtubules. Assays using okadaic acid, a PP2A inhibitor, showed an increase in microtubule-bound phospho-p53 and reduced sensitivity to chemotherapy. Our results suggest that Arl2 content could, via PP2A, influence p53 phosphorylation leading to its binding to microtubules and reduced nuclear translocation after exposure of cells to chemotherapeutic agents.

Introduction
Resistance to chemotherapeutic agents is a major problem in cancer treatment. The cellular mechanisms involved in this phenomenon have been studied for several years, and some factors have been identified. Various strategies to overcome resistance have been suggested, but none has yet shown efficacy *in vivo*. Taxanes and *vinca* alkaloids which target microtubules are of major importance in breast cancer treatment (Jordan & Wilson, 2004). At high concentrations, taxanes stimulate microtubule polymerization and stabilize microtubules whereas *vinca* alkaloids inhibit microtubule polymerization. By their common mechanism of suppressing microtubule dynamics at concentrations corresponding to those observed in the serum of exposed patients, these compounds block mitosis at the metaphase/anaphase transition, and induce cell death (Honore et al., 2005; Jordan, 2002; Jordan &

Wilson, 2004). Gemcitabine (2_,2_-difluorodeoxycytidine) is a nucleoside analogue that shows activity against hematologic malignancies and solid tumors such as breast cancer (Heinemann, 2003). The triphosphorylated form of gemcitabine is cytotoxic by incorporation into DNA, causing masked chain termination after the incorporation of an additional nucleotide after gemcitabine (Mini et al., 2006). Several lines of data suggest that ADP ribosylation factor like protein 2 (Arl2) plays a role in microtubule dynamics. Arl2 is a 21 kDa GTPase belonging to the ADP ribosylation factor (ARF) family (Antoshechkin & Han, 2002; Kahn et al., 2006; Kahn et al., 1991; Kahn et al., 2005). In mammalian cells, Bhamidipati *et al.* have demonstrated direct binding between Arl2 and tubulin binding cofactor D (TBC-D), a protein involved in tubulin folding (Bhamidipati et al., 2000; Tian et al., 1997). We have recently shown that MCF7 breast cancer cells with altered Arl2 levels contain modified polymerization-competent αβ–tubulin heterodimer pools, display profoundly altered microtubule dynamics (Beghin et al., in press). In a more recent study, Shern *et al.* copurified a 300 kDa complex from cytosol that was coenriched for the entire cytosolic pool of Arl2, TBC-D, and heterotrimeric protein phosphatase 2A (PP2A) (Shern et al., 2003). PP2A is one of the major serine/threonine phosphatases implicated in the regulation of many cellular processes including regulation of different signal transduction pathways such as cell cycle progression (Minshull et al., 1996), DNA replication (Janssens et al., 2005) and apoptosis (Van Hoof & Goris, 2003), and it is considered to be a tumor suppressor protein (Janssens et al., 2005). In our MCF7 variants containing modified levels of Arl2 protein, we have also shown alterations in the amount and catalytic activity of PP2Ac protein with no significant changes in PP2Ac mRNA suggesting a possible stabilization of PP2A by Arl2 (Beghin et al., in press, Exp Cell Res.). It has been shown that PP2A dephosphorylates p53 at different sites such as serine 15 (Messner et al., 2006) and serine 37 (Dohoney et al., 2004). The p53 tumour suppressor protein is a labile transcription factor that is activated and stabilized in response to a wide range of cellular stresses such as chemotherapeutic treatments cited above. Regulation of p53 activity by phosphorylation remains controversial. It has been suggested that phosphorylation at specific residues can affect the transcriptional activity of p53 and/or its selectivity toward different subsets of genes thus determining the specific type of cellular response to stress (Brooks & Gu, 2003; Jimenez et al., 1999). For example, in the nucleus, ser15 phosphorylation has been shown to enhance the interaction of p53 with transcriptional co-activators CBP and PCAF (Dumaz & Meek, 1999; Lambert et al., 1998; Liu et al., 1999). It has also been shown that phospho-ser15-p53 associates with centrosomes during mitosis (Morris et al., 2000; Tritarelli et al., 2004) . p53 associates with cellular microtubules and accumulates in the nucleus after DNA damage only in cells with a functional microtubule network and the microtubule motor protein dynein appears to be necessary for transport of p53 along microtubules (Giannakakou et al., 2000).

Results Arl2 content influences sensitivity to chemotherapy-induced cell death

We evaluated the percentage of sub G0-G1 cells by flow cytometry (Figure 1a). Unexposed cells contained less than 5% of sub G0-G1 cells for the three sublines. After incubation with taxol and vinorelbine, MA- cells had a significantly lower sub G0-G1 fraction than MP cells (respectively -50% and -20%, $p<0.05$). Conversely MA+ cells had a larger sub G0-G1 population than MP cells after incubation with taxol, vinorelbine and gemcitabine (respectively +200%, +100% and +150 %, $p<0.05$).These results were obtained for a concentration range from 1 to 100nM of

taxol or of vinorelbine and for a concentration range from 0,1 to 10µM of gemcitabine. To determine whether the MCF7 derived sublines presented differences in sensitivity to these compounds, we also evaluated the number of living cells after exposure to these compounds (Figure 1b). Incubations with taxol resulted in a significant decrease of the number of living MA+ cells ($p<0.05$, -55%) as compared to other cell lines. After incubation with vinorelbine, MA- cells had a higher number of living cells as compared to MP cells ($p<0.05$, +30%) while MA+ cells displayed a decrease the number of living cells in comparison with MP cells ($p<0.05$, -28%). We then evaluated the apoptotic population using an annexin V staining and fluorescence microscopy analysis (Figure 1c). Unexposed cells contained less than 1% annexin V positive cells in all sublines. After incubation with taxol, MA- had a lower apoptotic index (1%) than MP cells (3%) while MA+ cells displayed an increase of the apoptotic index (7%). Similar results were obtained with vinorelbine and gemcitabine (data not shown).
Overall these results suggest that increased Arl2 content induced chemosensitivity to antitumor agents while decreased Arl2 content was associated with resistance to various chemotherapeutic agents.

Arl2 content does not influence G2/M blockage induced by tubulin-binding agents

We measured the G2-M arrest after incubation with 10 nM of taxol or 10 nM of vinorelbine (Figure 2). As previously described (Beghin, 2006), unexposed MA- cells had a significantly lower G2/M fraction than the other unexposed cell lines. Consequently, we have presented the results as percentages and not as a ratio to the unexposed conditions. We observed no significant differences between the three sublines in the percentage of cells in G2-M after incubation with taxol or vinorelbine. Consequently, differences of sensitivity to anti microtubule agents described above do not seem to be due to a difference of G2/M cell cycle arrest in our models.

Differential p53 nuclear localization and activity after exposure to chemotherapeutic agents

It has previously been demonstrated that paclitaxel- and nocodazole-induced cell arrest is p53 and p21-dependent (Giannakakou et al., 2001; Lanni & Jacks, 1998) and we have found p21 mutations in a paclitaxel-resistant model (Galmarini et al., 2006). We therefore analyzed our cell models for presence of p53 in the nucleus using confocal microscopy (figure 3). After exposure to 1 µM gemcitabine MA- cells contained 2 fold less p53 positive nuclei in comparison with similarly exposed MP cells ($p<0.05$). Similar results were obtained after incubation with vinorelbine. Futhermore, after vinorelbine exposure, MA+ cells displayed a significant higher percentage of p53 positive nuclei ($p<0,05$, X1,8).). It has to be noticed that, at baseline the three sublines displayed a very low and similar percentages of p53 positive nuclei (<2%) (figure 3a). These results suggest that Arl2 content influences the ability of p53 to be translocated to the nucleus upon exposure to chemotherapeutic agents. Futhermore, we have studied several genes known to be transcriptional target of p53 by real-time quantitative rt-PCR after exposure to gemcitabine (figure 4a). A major target gene which participates in p53-mediated growth arrest is p21/Waf1, an inhibitor of cyclin-dependent kinases (Choisy-Rossi et al., 1998). PIG3 (p53-induced gene 3) is involved in apoptosis (el-Deiry, 1998). PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) was identified as a pro-apoptotic gene activated by p53 and is a Bcl-2 family member (mitochondrial pathway) (Yu & Zhang, 2003). After exposure to gemcitabine, we have observed that MA+ cells displayed a significantly higher increase of p21 and PUMA mRNA expression level

than MP cells (p<0,05, +30%). These cells also had a significantly higher increase of PIG3 in comparison with MA- cells (p<0,05, +70%). MA- cells had a significant lower increase of p21 after gemcitabine treatment as compared to MP cells (p<0,05, -40%). Similar results were obtained with anti microtubular agents. At the protein level (figure 4b), after exposure to 1 µM gemcitabine MA- cells contained 1,8 fold less and MA+ cells 1,2 fold more p21 positive nuclei than similarly exposed MP cells (p<0,05). No p21 staining was detectable at baseline for the three sublines. Similar results were obtained using anti microtubule agents. Consequently, Arl2 expression levels seem to influence the nuclear localization and the pro-apoptotic transcriptional activity of p53 after exposure to antitumor agents.

Arl2 content influences p53 distribution and phosphorylation

We investigated the distribution and phosphorylation of p53 under basal conditions in purified soluble tubulin and microtubule fractions (figure 5). Immunobloting with an anti p53 antibody (clone DO7) showed a different distribution of p53 forms in these fractions (figure 5a). In the three sublines, microtubules fractions were enriched with the slowest migrating form of p53 (apparent MW ~ 60 kDa) which was weakly present in the soluble tubulin fractions. This form was similar to that induced after exposure during 24 hours of cells to 150 nM doxorubicin (Adriblastine®; Pharmacia & Upjohn, France), compound known to induce phosphorylation of p53. Conversely, the fastest migrating form of p53 was weakly present in the microtubules fractions and was the most abundant form in the soluble tubulin fractions. Furthermore MA- cells had a larger content of the 60 kDa form in their microtubule fraction than MP and MA+ cells. Total p53 expression level and localization (figure 5b) was similar in the three sublines.

To determine which phosphorylated forms of p53 are preferentially bound to microtubules, we tested several antibodies specific for different phosphorylated forms of p53. We found that phospho-ser15-p53 was the only p53 form to be specific of the microtubule fractions and displaying differential expression between the three sublines. Phospho-ser15-p53 was found in the microtubule fractions at an apparent MW of 60 kDa and was not detectable in the soluble tubulin fractions (figure 6a). Furthermore, MA- cells displayed a significantly higher (+100%, p<0.05) content of phospho-ser15-p53 protein in their microtubule fraction and in total extracts than MP and MA+ cells. To determine if there were differences of phospho-ser15-p53 localization in entire cells, we performed immunocytochemistry with phospho-ser15-p53-specific antibody, and observed a centrosomal localization of phospho-ser15-p53 (figure 6b) in mitosis

cells of the three sublines, in keeping with previous studies (Morris et al., 2000; Tritarelli et al., 2004). No staining was detectable in interphasic MA-, MP or MA+ cells.

These results suggest that Arl2 content influences p53 phosphorylation status, particularly at serine 15, which is preferentially bound to microtubules.

PP2A is involved in p53 phosphorylation and in resistance to chemotherapeutic agents

To determine whether differences in PP2A content previously observed in our cells could be involved in p53 phosphorylation status, MP cells were incubated with 10 nM okadaic acid (dose selectively inhibiting PP2A, (Bialojan & Takai, 1988; Messner et al., 2006)). After 24 hours of incubation, we observed a significant and specific increase of the band corresponding to a phospho-p53 form in the soluble tubulin fraction (X3, p<0.05) with a marked increase in the microtubule fraction (X7, p<0.05)

(figure 7a). To establish a link between PP2A activity and sensitivity to chemotherapeutic agents in our lines, we preincubated MP cells with okadaic acid at 10 nM during 2 hours before performing a cytoxicity assay using taxol and vinorelbine (figure 7b). Preincubation with okadaic acid induced a significant increase of IC50 values for taxol and vinorelbine ($p<0.05$, respectively X2.6 and X50). These last results suggest a PP2A implication in p53 phosphorylation and localization and in the differential response to chemotherapeutic agents observed.

Discussion

In this work, we have showed that alterations in Arl2 content are associated with differences sensitivity to antitumor agents in MCF7 cells. Our data suggest that alterations in p53 localization and phosphorylation are involved in these sensitivity differences, through a PP2A mediated mechanism. In a number of tumor types that retain wild-type p53, loss of p53 activity is associated with a cytoplasmic “zip code.” In such cases, p53 is excluded from the nucleus as a result of cytoplasmic sequestration, or hyperactive nuclear export. Moreover, it has been shown that such cytoplasmic confinement of p53 is correlated with a higher resistance to radiotherapy and chemotherapy resulting in an independent unfavorable prognostic factor in cancer (O'Brate & Giannakakou, 2003). Consequently, we have chosen to process on analysis of p53 localization after antitumoral treatments using a non specific phospho p53 antibody (DO7) as it has also been shown that phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis (Thompson et al., 2004). As functional assay to evaluate the transcriptional activity of p53 we have studied three target genes implicated either in G1 arrest (p21) or in apoptosis induction (PIG3 and PUMA). Futhermore, PUMA is specific of the mitochondrial apoptosis induction pathway. Under chemotherapeutics agents, cells with a higher Arl2 content displayed the higher p53 positive nucleus rate and the nuclear p53 level for these cells seems to raise more easily or rapidly the threshold inducing p21, PIG3 and PUMA transcription. A low Arl2 level is associated with p53-induced apoptosis involving G1 arrest and the mitochondrial apoptotic pathway. p53 is a target of several phosphatases such as PP2A (Dohoney et al., 2004) (Messner et al., 2006) but also PP1 (Haneda et al., 2004) and PP5 (Zuo et al., 1998). We have identified the phosphorylation of serine 15 of p53 as likely to be involved in the phenotypes observed in our cell models. Nevertheless, complementary experiences are required using p53 serine 15 mutated forms to determine precisely the implication of phospho-ser15-p53 in our resistance phenotype. Here we have highlighted that the phospho-ser15-p53 was exclusively detectable on microtubule fractions of unexposed cells and presented a differential expression negatively correlated with Arl2 expression level. Nevertheless, the microtubule purification method does not prevent lysis of nucleus. Consequently, we have performed immunolocalization of phospho-ser15-p53 illustrating the fact that the increase of phospho-ser15-p53 observed in MA- cells was specific of a microtubular fraction without increase of a nuclear phospho-ser15-p53. In order to prove PP2A implication in p53 phosphorylation, we used okadaic acid at concentration selectively inhibiting PP2A and we have observed, in keeping with Messner et al. (Messner et al., 2006), that PP2A influenced p53 phosphorylation and induced its association with microtubules in our models. Furthermore, by performing a preincubation of cells with okadaic acid at the same selectively inhibiting PP2A concentration, we induced a strong resistance of cancer cells to anti microtubule treatments. Complementary studies should be performed to address the impact of a PP2A/Arl2 complex on p53

phosphorylation and its affinity to purified microtubules. We can conclude that a decrease of Arl2 could, via a PP2Ac mediated mechanism, induce an increase of at least one phosphorylated form of p53 (ser 15) which is preferentially bound to microtubules. In these cells, p53 could not be efficiently translocated into the nucleus to after exposure to chemotherapeutic treatments. These data raise the possibility that preferential binding of some phosphorylated forms of p53 to microtubules could lead to the sequestration of active forms of p53 and inhibit its transcriptional activity. We can hypothesize that therapeutic strategies targeting Arl2 by enhancing the content of this protein would induce a higher sensibility of cancer cells to treatments.

Materials and methods MCF7 derived cell lines
MCF7 cells (human adenocarcinoma breast cells) were stably transfected with empty pcDNA3 (MCF7/pcDNA3 (MP) cells), pcDNA3 containing sense Arl2 (MCF7/Arl2+ (MA+) cells) or antisense Arl2 (MCF7/Arl2- (MA-) cells) as previously described (Beghin et al., in press, Exp Cell Res.).

Analysis of cell cycle distribution by flow cytometry
MA-, MP and MA+ cells were incubated for 48 hours with a concentration range from 1 to 100 nM taxol (Bristol-Myers Squibb, New York, USA) or vinorelbine (Pierre Fabre medicaments, Boulogne, France) to study G2/M arrest, or for 72 hours with same concentration range of taxol or vinorelbine or with concentration range from 0.1 to 10 µM gemcitabine (Gemzar®; Lilly, USA).for the G0-G1 phase detection. Cell cycle analysis were performed as previously described (Beghin, 2006) propidium iodide staining. Cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgium) and Modfit LT 2.0™ software (VeritySoftware Inc, Topsham, USA).

Quantification of annexin V positive cell percentage by microscopy
After 72 hours of 10 nM taxol or vinorelbine or 1 µM gemcitabine exposures, cells were fixed by incubation in 4% paraformaldehyde during 15 min and non specific sites were blocked by a PBS solution containing 3% bovine albumin, and 1% fetal calf serum. Annexin V staining was performed as suggested by the manufacturer (Roche, Manheim, Germany). DAPI was used instead of propidium iodide to counter-stain DNA (Roche, Manheim, Germany) and evaluate the percentage of adherent cells. Images were obtained using a laser scanning Leica DMR-RXA microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) at the Centre Commun de Quantimétrie (Université Lyon 1, France). At least 300 cells were counted for each subline.

Quantitative real time RT-PCR
Total mRNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative rt-PCR were performed as previously described using a LightCycler thermal cycler (Roche, Manheim, Germany) (Beghin, 2006; Galmarini et al., 2002; Jordheim et al., 2004) and after 48 hours of 1 µm gemcitabine or 10 nM taxol or vinorelbine exposures. The program used for genes of interest was denaturation at 95°c during 15 sec, annealing at 59°c during 30 sec and extension at 72°c during 10 sec phases. Forward and reverse primer sequences used for p21/Waf1 were 5'-TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC and 3'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA, for PIG3: 5'-CAACGCTGAAATTCACCAAA and 3'-GGATCCGCCTATGCAGTCTA and for PUMA alpha/beta: 5'-GACCTCAACGCACAGTACGA and 3'-

AGGACCCTCCAGGGTGAG. Results are expressed in arbitrary units using the corresponded unexposed cell line as reference.

Immunofluorescence and analysis by confocal microscopy
Cells exposed to 10 nM taxol or vinorelbine or to 1 µM gemcitabine for 72 hours and unexposed cells were processed for immunofluorescence assay as previously described (Beghin, 2006). Cells were incubated with a monoclonal anti-phospho-ser15-p53 primary antibody (16G8 clone, Cell Signaling Technology, Boston, USA) or a p53 primary antibody (DO7 clone, Dako, Glostrup, Denmark) or a p21 primary antibody (Oncogene Science, USA) followed by a secondary anti-mouse FITC-antibody or PE-antibody (Dako, Glostrup, Denmark). Yellow color corresponds to a strong signal and dark green to a weak signal. For p53 and p21 positive nuclei determination, at least 600 cells were counted for each subline. Percentages of positive staining nucleus were made by ratio on unexposed cells.

Total protein extraction and Western Blot analysis
Protein extraction and Western blot analysis were performed as previously described (Beghin, 2006; Galmarini et al., 2001) and after cell exposure to 150 nM doxorubicin. Comparison between the three lines was performed using MP as the reference line (100% value), after standardization of β–tubulin values. Antibody against pan-β-tubulin (Tub 2.1 clone, was purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Antibodies against p53 (DO7 clone) were purchased from Dako (Glostrup, Denmark) and specific antibodies directed against phospho-serine forms of p53 (phospho-ser6, phospho-ser9, phospho-ser15 (monoclonal: 16G8 clone), phospho-ser20, phospho-ser37, and phospho-ser392) were from Cell Signaling Technology (Boston, USA).

Separation of microtubular fraction
The method we used is derived from a previously described assay using a specific buffer to induce tubulin polymerization (Newton et al., 2002; Sillje & Nigg, 2006). Briefly, 20.10^6 cells were harvested, immediately resuspended in 100 µl of lysis buffer (100 mM Pipes, pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM $MgSO_4$) and lysed by one freeze-thaw cycle. Lysed cells were ultracentrifuged (100,000 g, 1 hour, 20 °C). Supernatants contained soluble proteins (named “soluble” fraction). Pellets containing polymerized tubulin were resuspended in 200 µl of lysis buffer, incubated at 4°C during 45 minutes to induce microtubule depolymerisation, and ultracentrifuged (50,000 g, 45 min, 4°C). The resulting supernatants underwent a cycle of polymerization in the presence of 1 mM GTP at 35 °C, ultracentrifuged and the resulting pellets contained purified microtubule proteins (named microtubules or “MT” fraction). Microtubules and soluble fractions were then analyzed by Western Blot analysis.

Cytotoxicity studies
Cytotoxicity studies were performed as previously described (Jordheim et al., 2005). MP cells were plated at 1,000 cells per well in 96-well plates, and exposed 24 hours later to 10 nM of okadaic acid (Biovision Inc., USA) for 2 hours. Medium was then removed and replaced with medium containing different concentrations of taxol and vinorelbine. After 6 days, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide was added and the supernatant was replaced with isopropanol/H_2O/HCl. The IC50 was defined as the concentration inhibiting proliferation to a level equal to 50% of that of controls.

Acknowledgements:
We thank Dr Martine Ffrench for p21 antibody, Benjamin Bouchet for PCR primers, Dr Lars Jordheim, Pr. Alain Puisieux and Dr. Claude Caron de Fromentel for technical suggestions and helpful discussions. This work was supported in part by the Association pour la Recherche contre le Cancer and the Comité de Saône et Loire de la Ligue Contre le Cancer.

ABBREVIATIONS LIST
FACS: fluorescence activated cell sorter MA- :MCF7/Arl2-MA+: MCF7/Arl2+ MP: MCF7/pcDNA3

References:

Antoshechkin, I. & Han, M. (2002). *Dev Cell*, **2,** 579-91. Beghin, A. (2006). *Experimental Cell Research, in press*,
http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.10.024.
Bhamidipati, A., Lewis, S.A. & Cowan, N.J. (2000). *J Cell Biol*, **149,** 1087-96.
Bialojan, C. & Takai, A. (1988). *Biochem J*, **256,** 283-90.
Brooks, C.L. & Gu, W. (2003). *Curr Opin Cell Biol*, **15,** 164-71.
Choisy-Rossi, C., Reisdorf, P. & Yonish-Rouach, E. (1998). *Toxicol Lett*, **102-103,** 491-6.
Dohoney, K.M., Guillerm, C., Whiteford, C., Elbi, C., Lambert, P.F., Hager, G.L. & Brady, J.N. (2004). *Oncogene*, **23,** 49-57. Dumaz, N. & Meek, D.W. (1999). *Embo J*, **18,** 7002-10. el-Deiry, W.S. (1998). *Semin Cancer Biol*, **8,** 345-57. Galmarini, C.M., Bouchet, B.P., Audoynaud, C., Lamblot, C., Falette, N., Bertholon, J.,
Wang, Q., Beghin, A., Dumontet, C. & Puisieux, A. (2006). *Int J Cancer*, **119,** 60-6.
Galmarini, C.M., Clarke, M.L., Falette, N., Puisieux, A., Mackey, J.R. & Dumontet, C. (2002). *Int J Cancer*, **97,** 439-45.
Galmarini, C.M., Falette, N., Tabone, E., Levrat, C., Britten, R., Voorzanger-Rousselot, N., Roesch-Gateau, O., Vanier-Viornery, A., Puisieux, A. & Dumontet, C. (2001). *Br J Cancer*, **85,** 902-8.
Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T. & Blagosklonny, M.V. (2001). *Oncogene*, **20,** 3806-13.
Giannakakou, P., Sackett, D.L., Ward, Y., Webster, K.R., Blagosklonny, M.V. & Fojo, T. (2000). *Nat Cell Biol*, **2,** 709-17. Haneda, M., Kojima, E., Nishikimi, A., Hasegawa, T., Nakashima, I. & Isobe, K. (2004). *FEBS Lett*, **567,** 171-4. Heinemann, V. (2003). *Oncology*, **64,** 191-206.
Honore, S., Pasquier, E. & Braguer, D. (2005). *Cell Mol Life Sci*, **62,** 3039-56. Janssens, V., Goris, J. & Van Hoof, C. (2005). *Curr Opin Genet Dev*, **15,** 34-41. Jimenez, G.S., Khan, S.H., Stommel, J.M. & Wahl, G.M. (1999). *Oncogene*, **18,** 7656-65.
Jordan, M.A. (2002). *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **2,** 1-17. Jordan, M.A. & Wilson, L. (2004). *Nat Rev Cancer*, **4,** 253-65. Jordheim, L.P., Cros, E., Gouy, M.H., Galmarini, C.M., Peyrottes, S., Mackey, J., Perigaud,
C. & Dumontet, C. (2004). *Clin Cancer Res*, **10,** 5614-21. Jordheim, L.P., Guittet, O., Lepoivre, M., Galmarini, C.M. & Dumontet, C. (2005). *Mol Cancer Ther*, **4,** 1268-76. Kahn, R.A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R.C., Munro, S. & Schurmann, A. (2006). *J Cell Biol*, **172,** 645-50. Kahn, R.A., Kern, F.G., Clark, J., Gelmann, E.P. & Rulka, C. (1991). *J Biol Chem*, **266,** 2606-14. Kahn, R.A., Volpicelli-Daley, L., Bowzard, B., Shrivastava-Ranjan, P., Li, Y., Zhou, C. & Cunningham, L. (2005). *Biochem Soc Trans*, **33,** 1269-72. Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhattar, R. & Brady, J.N. (1998). *J Biol*
Chem, **273,** 33048-53.
Lanni, J.S. & Jacks, T. (1998). *Mol Cell Biol*, **18,** 1055-64.
Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. & Berger, S.L. (1999). *Mol Cell Biol*, **19,** 1202-9.
Messner, D.J., Romeo, C., Boynton, A. & Rossie, S. (2006). *J Cell Biochem.*
Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. (2006). *Ann Oncol*, **17 Suppl 5,** v7 v12. Minshull, J., Straight, A., Rudner, A.D., Dernburg, A.F., Belmont, A. & Murray, A.W. (1996). *Curr Biol*, **6,** 1609-20.
Morris, V.B., Brammall, J., Noble, J. & Reddel, R. (2000). *Exp Cell Res*, **256,** 122-30.
Newton, C.N., DeLuca, J.G., Himes, R.H., Miller, H.P., Jordan, M.A. & Wilson, L. (2002). *J*

Biol Chem, **277,** 42456-62.
O'Brate, A. & Giannakakou, P. (2003). *Drug Resist Updat*, **6,** 313-22.
Shern, J.F., Sharer, J.D., Pallas, D.C., Bartolini, F., Cowan, N.J., Reed, M.S., Pohl, J. & Kahn,
R.A. (2003). *J Biol Chem*, **278,** 40829-36. Sillje, H.H. & Nigg, E.A. (2006). *Methods*, **38,** 25-8. Thompson, T., Tovar, C., Yang, H., Carvajal, D., Vu, B.T., Xu, Q., Wahl, G.M., Heimbrook,
D.C. & Vassilev, L.T. (2004). *J Biol Chem*, **279,** 53015-22. Tian, G., Lewis, S.A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C. & Cowan, N.J. (1997). *J Cell Biol*, **138,** 821-32. Tritarelli, A., Oricchio, E., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Lavia, P., Soddu, S. & Cundari, E. (2004). *Mol Biol Cell*, **15,** 3751-7. Van Hoof, C. & Goris, J. (2003). *Biochim Biophys Acta*, **1640,** 97-104. Yu, J. & Zhang, L. (2003). *Cancer Cell*, **4,** 248-9. Zuo, Z., Dean, N.M. & Honkanen, R.E. (1998). *J Biol Chem*, **273,** 12250-8.

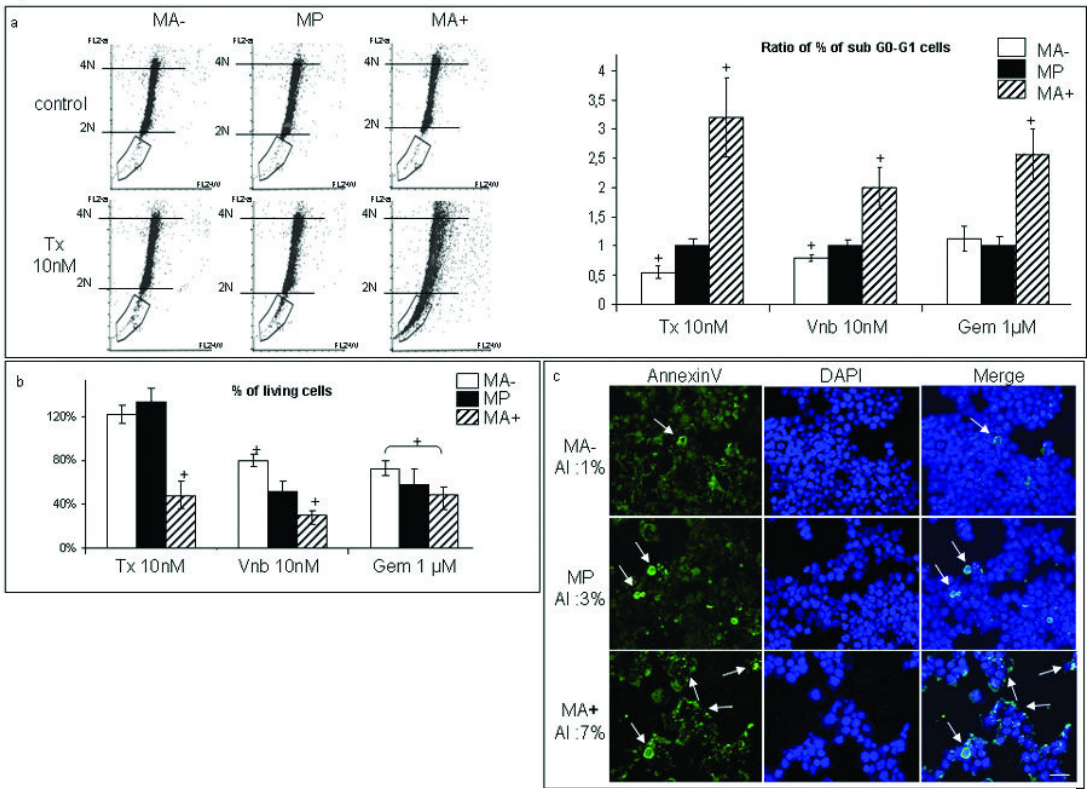
Titles and legends to figures: **Figure 1: Cell death and apoptosis evaluation of MA-, MP and MA+ cells incubated with different anti tumoral drugs.** a: MA-, MP and MA+ cell distributions in subG0-G1 phase evaluated by flow cytometry on unexposed cells (control) and after 10 nM Taxol (Tx) or 10 nM Vinorelbine (Vnb) or 1 µm gemcitabine (Gem) treatments (left: representative distribution plots, right: means of percentages of cells in subGO-G1 phase).b: Evaluation, by microscopy after DAPI DNA-staining, of percentage of adherent cells in presence of 10 nM Taxol (Tx), of 10 nM Vinorelbine (Vnb) and of 1 µM gemcitabine (Gem) treatments upon unexposed condition. Bars represented standard deviations. c: representative images of each subline exposed with 10 nM Taxol after AnnexinV (green) and DNA (DAPI, blue) staining. Mean apoptotic indices (AI) were evaluated by confocal microscopy of 300 cells in at least 3 different images. Scale bar represents 20 µm. White arrows represent positive AnnexinV cells. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : p
<0.05 between subline of interest and other sublines).
Figure 2: G2/M arrest of MA-, MP and MA+ cells after anti mcirotubule drugs exposure. MA-, MP and MA+ cell distributions in G2-M phase evaluated by flow cytometry on unexposed cells (control) and after 10 nM Taxol (Tx) or 10 nM Vinorelbine (Vnb) exposure (left: representative distribution plots, right: means of percentages of cells in G2-M phases). Bars represented standard deviations. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : p <0.05 between subline of interest and other sublines).
Figure 3: p53 staining of MA-, MP and MA+ cells incubated with different anti tumoral drugs. a: Representative images of each subline unexposed (control) and exposed with 1 µM gemcitabine (Gem) and with 10 nM Vinorelbine after p53 (DO7 clone) (yellow/green) and DNA (DAPI, blue) staining. b: means of ratio of p53 positive nuclei percentages were evaluated by confocal microscopy upon control cells. Scale bar represents 30 µm. Bars represented standard deviations. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : p <0.05 between subline of interest and other sublines).
Figure 4: Evaluation of p53 transcriptional activity after gemcitabine exposure of MA-, MP and MA+ cells. a : means of expression levels of p21/waf1 (p21), PIG3 and PUMA mRNA in MA-, MP and MA+ gemcitabine exposed-cells, determined by quantitative real time RT-PCR, expressed in arbitrary units (AU), and rationalized upon corresponded unexposed cells. b: representative images of each subline exposed with 1 µM gemcitabine (Gem) after p21 (yellow/green) and DNA (DAPI,

blue) staining and means of p21 positive nuclei percentages were evaluated by confocal microscopy. Scale bar represents 10 µm. Bars represented standard deviations. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : $p < 0.05$ between exposed and control conditions and * $p<0.05$ between interest exposed cells and exposed MP cells). **Figure 5: Expression profile of p53 in MT fractions of MA-, MP and MA+ cells**. a: Left: representative Western Blot of p53 profile and β-tubulin levels in soluble and microtubule (MT) fractions and means of p53 expression levels. Right: representative blot of p53 profile in total extracts from unexposed (control) and 150 nM doxorubicinexposed (Doxo) MP cells and from unexposed (control) soluble and microtubule (MT) MP cells fractions. b: representative images of each subline after p53 (DO7 clone) (yellow/green) and DNA (DAPI, blue) staining. Scale bar represents 40 µm. Bars represent standard deviations. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : $p < 0.05$ between subline of interest and other sublines).

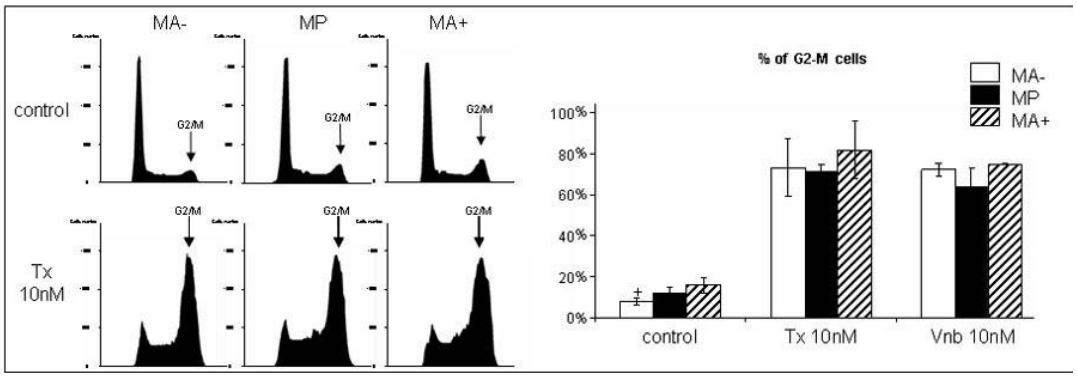
Figure 6: Distribution and localization of phospho-ser15-p53 in MA-, MP and MA+ cells. a: Representative Western Blot of phospho-ser15–p53 (pser15-p53) levels and β-tubulin levels in soluble, microtubule (MT) and total extracts and means of phospho-ser15-p53 expression levels. b: representative images of each subline after phospho-ser15-p53 (Red) and DNA (DAPI, blue) staining upon cell cycle phases. Scale bar represents 10µM for images of interphasic cells and 5µM for images of mitotic cells Bars represent standard deviations. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : $p < 0.05$ between subline of interest and other sublines).

Figure 7: Implication of PP2A in p53 cell localization and in resistance phenotype. a: Lower: representative Western Blot of p53 profile in soluble and MT extracts from unexposed (control) and 10 nM okadaic acid (OA) exposed MA+ cell line (lower) and means of p53 distribution after OA treatment. b : means of IC50 of taxol (Tx) and vinorelbine (Vnb) to unexposed MP cells (control) and to okadaic acid preincubated (OA) MP cells. Statistical significance was determined using Student's *t* test (+ : $p < 0.05$ between subline of interest and other sublines).

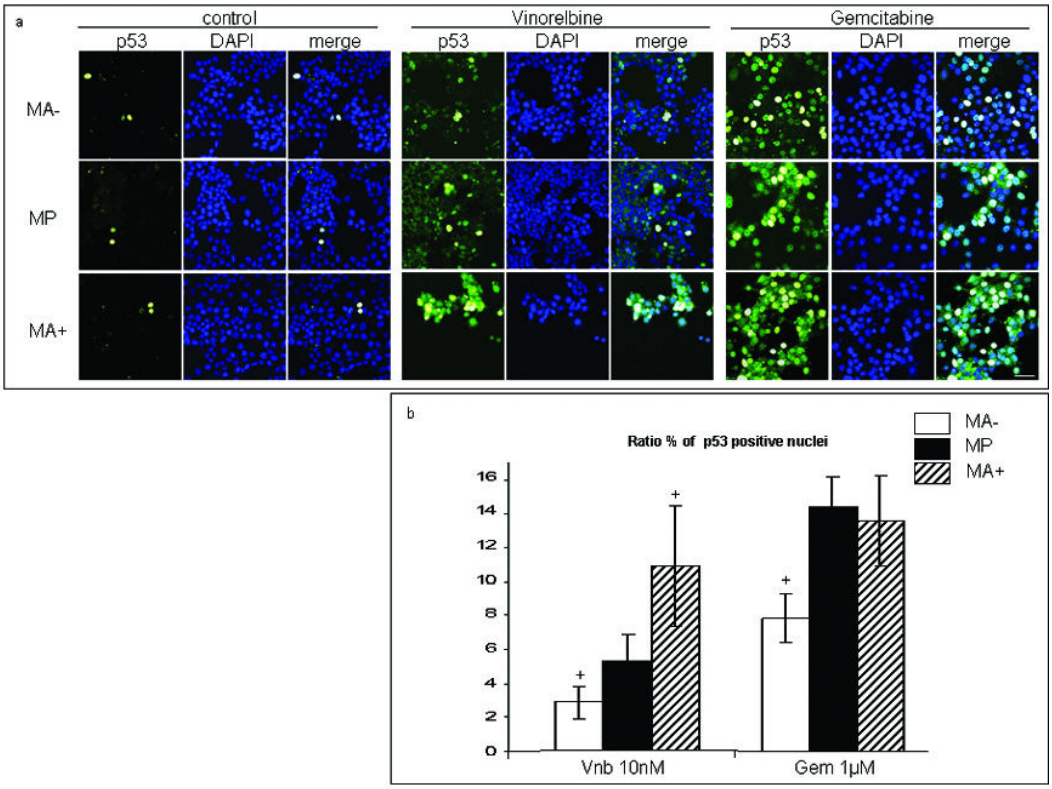
1


a
MA-
MP
MA+
control
Tx 10nM
4N
2N
Ratio of % of sub G0-G1 cells
Tx 10nM
Vnb 10nM
Gem 1µM
b
% of living cells
120%
80%
40%
0%
c
AnnexinV
DAPI
Merge
MA- AI :1%
MP AI :3%
MA+ AI :7%

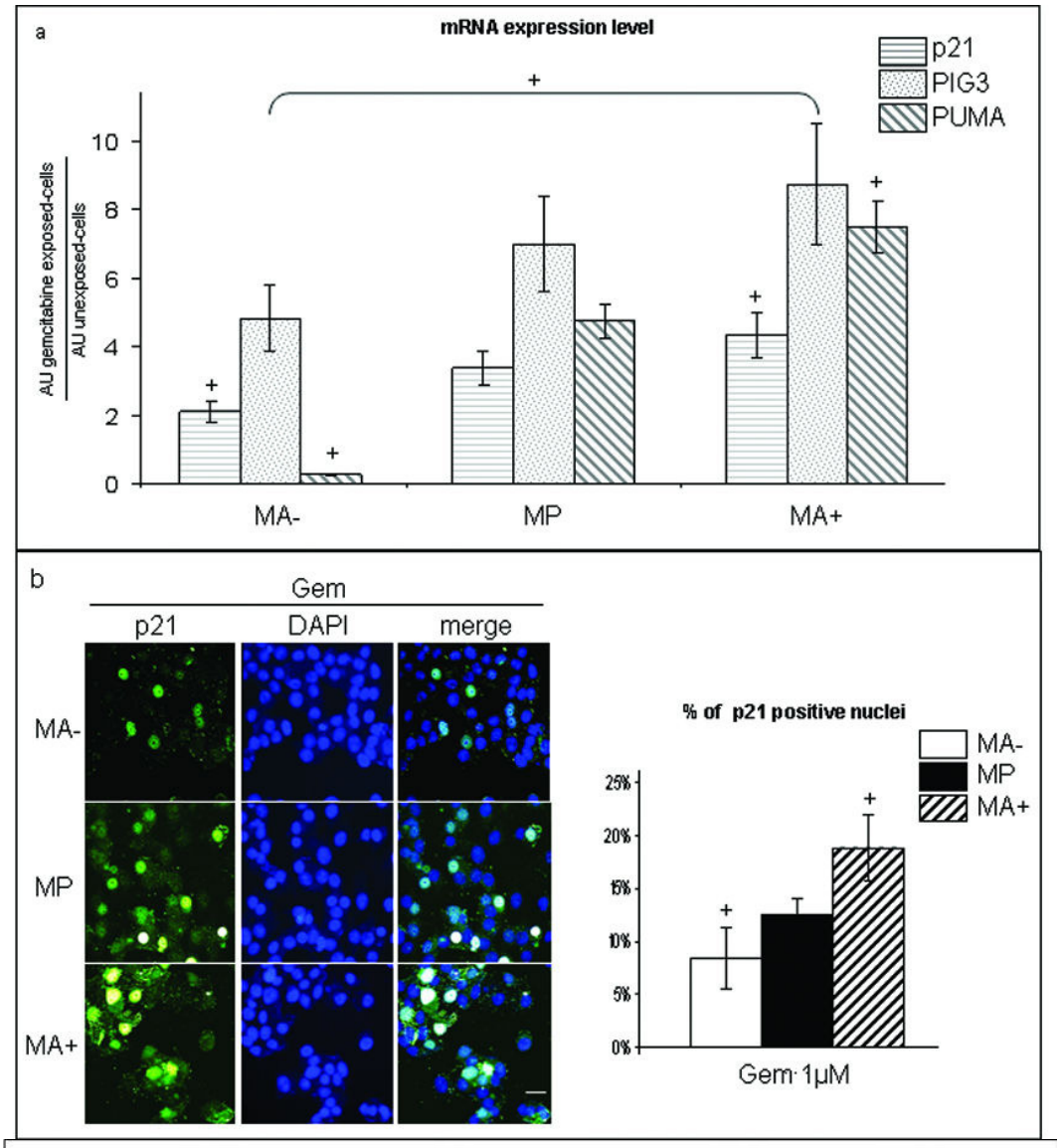
2


MA-
MP
MA+
control
Tx 10nM
G2/M
% of G2-M cells
100%
80%
60%
40%
20%
0%
control
Tx 10nM
Vnb 10nM

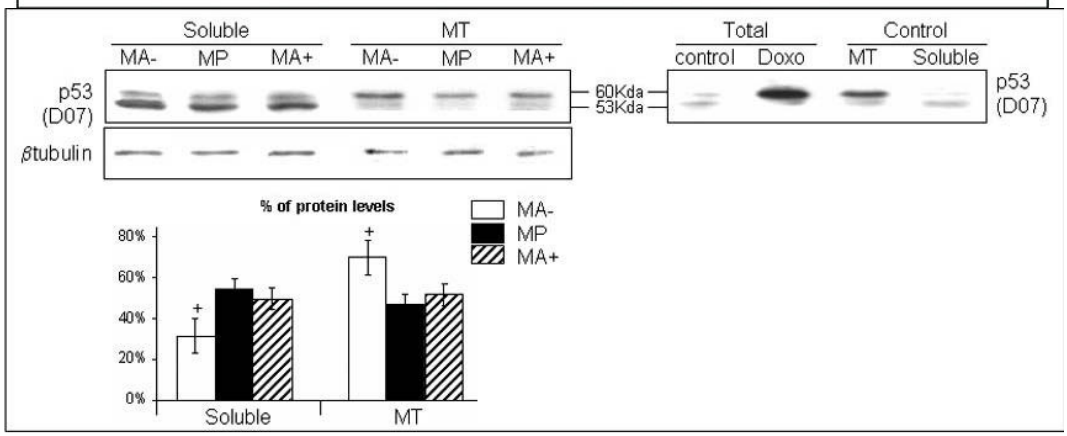
3


a
control
Vinorelbine
Gemcitabine
p53
DAPI
merge
MA-
MP
MA+
b
Ratio % of p53 positive nuclei
MA-
MP
MA+
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Vnb 10nM
Gem 1µM

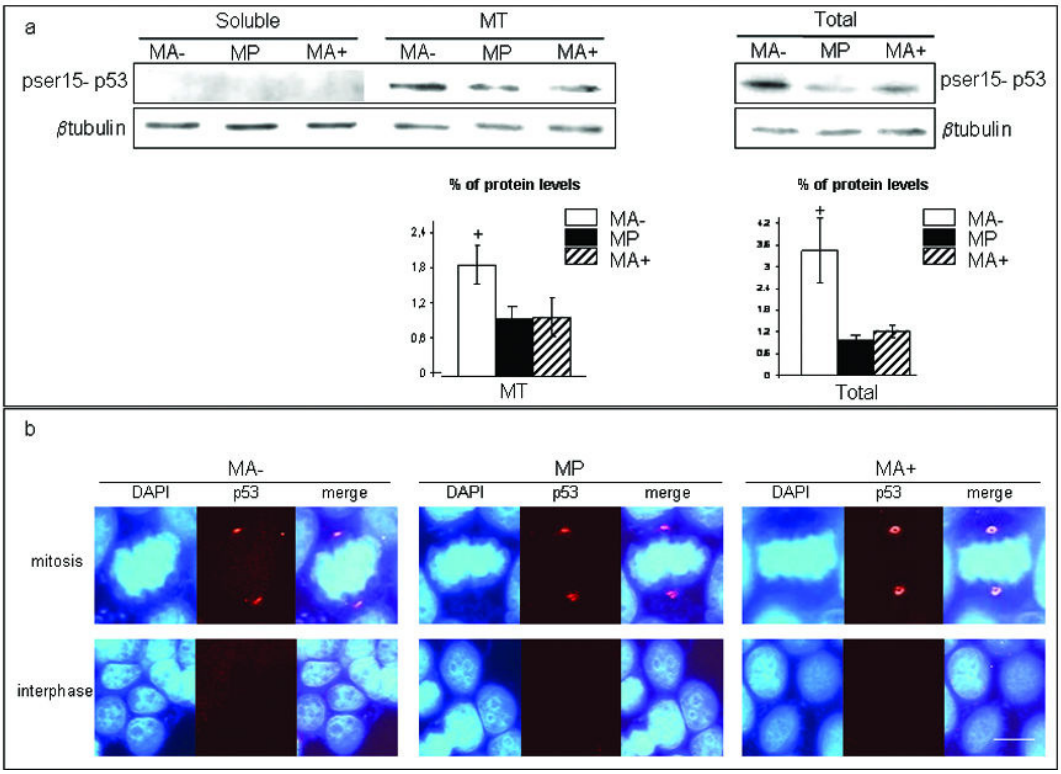
4


a
mRNA expression level
p21
PIG3
PUMA
AU gemcitabine exposed-cells / AU unexposed-cells
MA-
MP
MA+
b
Gem
p21
DAPI
merge
MA-
MP
MA+
% of p21 positive nuclei
Gem 1µM

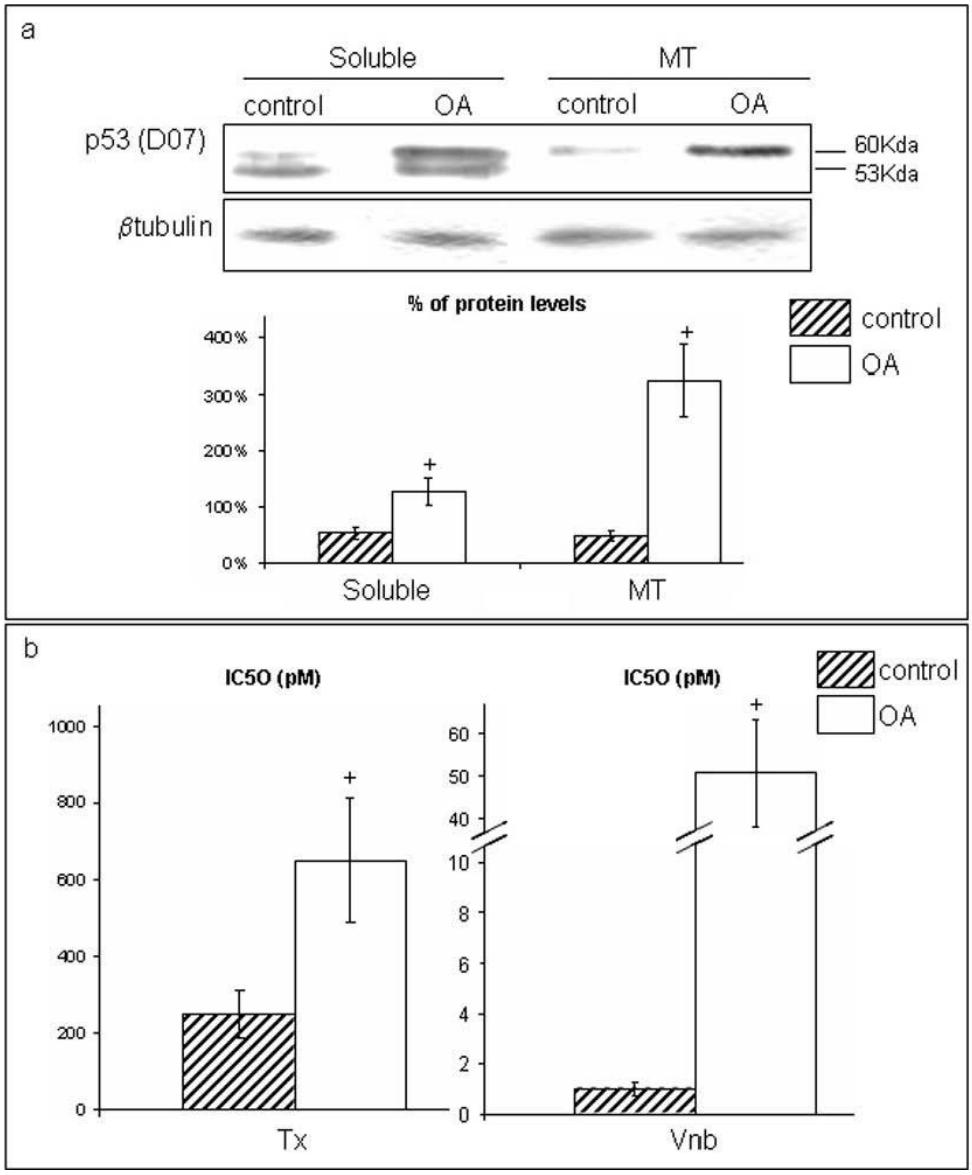
5


Soluble
MT
Total
Control
control
Doxo
p53 (D07)
βtubulin
60Kda
53Kda
% of protein levels
Soluble
MT

6


a
Soluble
MT
Total
MA- MP MA+ MA- MP MA+ MA- MP MA+
pser15- p53
βtubulin
pser15- p53
βtubulin
% of protein levels
MA-
MP
MA+
MT
% of protein levels
MA-
MP
MA+
Total
b
MA-
MP
MA+
DAPI p53 merge DAPI p53 merge DAPI p53 merge
mitosis
interphase

7


a
Soluble
MT
control
OA
control
OA
p53 (D07)
60Kda
53Kda
βtubulin
% of protein levels
control
OA
400%
300%
200%
100%
0%
Soluble
MT
b
IC50 (pM)
IC50 (pM)
control
OA
1000
800
600
400
200
0
60
50
40
10
8
6
4
2
0
Tx
Vnb

12.3. Annexe 3 : article 3

Int. J. Cancer: **119**, 60–66 (2006)
© 2006 Wiley-Liss, Inc.

A p21/WAF1 mutation favors the appearance of drug resistance to paclitaxel in human noncancerous epithelial mammary cells

Carlos María Galmarini[1]*, Benjamin Pierre Bouchet[1], Carole Audoynaud[1], Christelle Lamblot[1], Nicole Falette[1], Jacques Bertholon[2], Qing Wang[1], Anne Beghin[2], Charles Dumontet[2] and Alain Puisieux[1]

[1]*Unité d'Oncologie Moléculaire. Centre Léon Bérard, Lyon, France*
[2]*INSERM U590, Centre Léon Bérard, Lyon, France*

We investigated the mechanisms responsible for paclitaxel resistance in HME-1 cells (human mammary epithelial cells immortalized with hTERT). These cells were exposed to paclitaxel (10 pM for 7 days) and 20 cellular surviving populations (PSP) were obtained. PSP demonstrated high levels of resistance to paclitaxel cytotoxicity as compared with HME-1 cells. Activation of *mdr-1* gene expression was observed in 2 PSP. Protein expression analysis using a C-terminal targeted antibody showed that 13 PSP were negative for p21/WAF1 expression after ionizing radiation (6 Gy) or doxorubicin (100 nM) treatment. Sequencing of the 3 exons of the *CDKN1A* gene revealed that 13 PSP contained a point mutation in exon 2. This mutation consisted in a T insertion at codon 104 leading to a premature STOP codon appearance. Mismatch amplification mutation assay and RFLP-PCR confirmed the presence of the mutation in 16 PSP. Western blot using an N-terminal targeted antibody demonstrated that the C-terminal-truncated p21/WAF1 protein (14 kDa) was indeed expressed in the 13 PSP. Our data suggest that p21/WAF1 inactivation may confer a strong resistance to paclitaxel in noncancerous breast epithelial cells harboring a p21/WAF1 mutant.
© *2006 Wiley-Liss, Inc.*

Key words: paclitaxel; cyclin-dependent kinase inhibitor p21; antineoplastic agent resistance

Paclitaxel is one of the most effective anticancer drugs used in the clinic to treat a variety of solid tumors. In breast cancer patients, administration of paclitaxel in combination or sequentially with other chemotherapy drugs for the treatment of metastatic disease demonstrated to have more anticancer activity than previous nonpaclitaxel chemotherapy regimens.[1] Moreover, recent clinical trials also demonstrated that the use of paclitaxel as adjuvant therapy in early stage breast cancer patients helps to prevent relapse after the initial primary surgical treatment.[2,3]

Despite paclitaxel increasing use, especially in therapy of curable cancers, no data are currently available on its effects on noncancerous human breast epithelial cells. This prompted us to expose hTERT-immortalized human mammary epithelial cells to a stringent selection by this agent in a 7-day drug exposure. We then analyzed the emergence of surviving cells in parallel populations. In contrast to prevalent cellular models of drug resistance derived by multiple stepwise selections, the PSP in our model have experienced a single paclitaxel treatment at concentration levels and time exposure similar than those used in clinical practice. In these experiments, *mdr-1* expression was found to be positive by RT-PCR in 2 of 20 PSP (10%). Given the fact that the *mdr-1*-negative PSP displayed resistance to paclitaxel, we sought to determine whether other alterations existed in these PSP. Our findings indicate that mutations of the *p21/WAF1* gene are involved in resistance to this agent.

Material and methods

Reagents

Paclitaxel was obtained from Bristol-Myers Squibb (Paris, France). Antibodies against C-terminal-p21/WAF1 (SX-118), p53 (DO7) and TRITC-conjugated antimouse antibodies were purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). Antibodies against Bax were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Antibodies against N-terminal p21/WAF1 were purchased from UPSTATE (Waltham, USA). Antibodies against mdm-2 were given by B. Wasylyk. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Covalab (Oullins, France). Propidium iodide, MTT and Hoescht 33258 were purchased from Sigma (Saint Quentin, France).

Cell lines

HME-1 cells are telomerase-immortalized cells that stably express hTERT. This cell line was given by C. Theillet (Montpellier, France).

Obtention of paclitaxel-surviving populations

One 75-cm^2 tissue culture flask (Corning, NY) was seeded with HME-1 cells at low density (10^6 cells) and allowed to grow to near confluence (~70%). Cell population from this flask was seeded into 20 separate 96-well plates at a concentration of 100 cells per well. The following day, treatment with paclitaxel was begun at a dose of 10 pM. The drug-containing medium was changed every day over a period of 7 days then replaced with drug-free medium. Surviving populations were allowed to grow for 2–3 weeks. Wells containing paclitaxel-surviving populations were harvested, frozen and expanded in drug-free medium for other studies. A control experiment was performed to evaluate the spontaneous development of cell resistance. For this purpose, 18 clones of HME-1 cells (CC) were obtained by limiting dilution (0.1 cell per well) with no exposure to the drug.

To avoid the genetic drift and accumulation of chromosomal aberrations, which are known to occur over time during continuous cell culture, all experiments were performed immediately after the expansion period of HME-1 cells as well as CC and PSP surviving clones.

Growth inhibition assays and cell proliferation assay

Short-term growth inhibition assay was determined in 3 separate experiments, each of which was performed in triplicate using the MTT assay as previously described.[4] Results were expressed as fold-resistance of CC and PSP in comparison to the parental cell line HME-1. Clones displaying a resistant ratio of >2 were considered as stably resistant to paclitaxel.

To examine differences in cell growth of the different cell lines, MTT assay was performed in HME-1, CC and PSP cells seeded at a density of 7×10^3 cells per well into 96-well plate in complete culture media. MTT assay was performed after 72 hr as described

Abbreviations: CC, control clones; CDKN1A/p21/WAF1, cyclin dependent kinase inhibitor 1A gene; HME 1, human mammary epithelial cells; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; *mdr 1*, multidrug resistance 1; MTT, 3 [4,5 dimethylthiazol 2 yl] 2,5 diphenyl tetrazolium bromide; PCR, polymerase chain reaction; PSP, paclitaxel surviving populations; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

***Correspondence to:** Unité d'Oncologie Moléculaire Centre Léon Bérard, 28, avenue Laënnec 69373 Lyon CEDEX 08 France.
Fax: +33 4 78 78 28 21. E mail: fgalma@rockefeller.univ lyon1.fr
Received 26 September 2005; Accepted 24 November 2005
DOI 10.1002/ijc.21770
Published online 23 January 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

earlier. Results were expressed as percentage of CC and PSP cell proliferation compared to HME-1 cells.

RT-PCR for mdr-1 detection

PCR primers used for *mdr-1* were: for 5′-tcttggcagcaattagaact; rev 5′-cgatttcataagctgctcc. Primers for GAPDH were: for 5′-catccctctccccacacac; rev 5′-agtcccagggctttgatttg. The PCR products of *mdr-1* (326 bp) and GAPDH genes were separated by electrophoresis on a 3 and 10% agarose gel, respectively, and visualized by staining with ethidium bromide.

Northern and Western blots

CDKN1A p21/WAF1 gene expression was analyzed by Northern blot analysis. For this purpose, total RNA was extracted using Tri-Reagent (Sigma), as previously described.[4]

p53, p21/WAF1, mdm-2 and Bax protein expression was determined by Western blot analysis at basal conditions and after γ irradiation (6 Gy) at different time intervals as described previously.[4]

Immunofluorescence and microscopy

Exponentially growing cells were plated on 18-mm microscope glass slides and incubated with doxorubicin (100 nM; 24 hr). Then, cells were fixed in 100% methanol and primary antibodies were added. A TRITC antimouse antibody was used as a secondary antibody for p21/WAF1 staining. DNA was counterstained with 5 μg/ml Hoescht 33258. Coverslips were examined with a Zeiss axioplasm microscope using a Zeiss ×100 1.3 oil-immersion objective.

DNA extraction, PCR amplification and sequence analysis of CDKN1A/p21/WAF1

Genomic DNA was used as a substrate for amplification of the 3 exons of the *CDKN1A/ p21/WAF1* gene by PCR. Exon 1 was amplified with primers: for: 5′-ggcggggcggttgtatatca, rev: 5′-cgcgcacttagagacaccgtgt. Exon 2 was amplified with primers: for: 5′-tagtgtctatccgccgtga, rev: 5′-tctgagaatcctgctcccttaca. Exon 3 was amplified with primers: for: 5′-ctccgccgcgtcctcttct, rev: 5′-gtaccacccagcggacaagtg.

All cell lines were screened for mutations in the *CDKN1A/p21/WAF1* gene. Sequencing was performed with the Bigdye PRISM preready kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Electrophoresis, band visualization and sequence analysis were automatically performed on the ABI 377 automatic sequencer (Applied Biosystems).

Specific PCR for CDKN1A/p21/WAF1 gene mutation

Each DNA sample was subjected to PCR reactions using the following primers: for-5′-tcagttgcctgctctcccagt; rev-5′-catggtcttcctctgctgtcca. The positive identification of the mutated allele was the result of amplification of a 560-bp PCR product. All PCR reactions were performed on a GeneAmp PCR System 9600 from PerkinElmer.

Restriction fragment length polymorphism

A 551-bp fragment was generated by PCR using as sense primer 5′-cagttgcctgctctcccagt, and as antisense primer 5′-ggacccttcagcctgctcc. After purification of the PCR product by centrifugation through a Centricon 30 column, the DNA was digested with the BsmfI restriction enzyme (Biolabs, Beverly), according to the manufacturer's specification.

Results

Selection of paclitaxel-surviving populations

PSP appeared in 16 of 20 plates. The average number of positive wells per plate was 1. Similar experiments were performed with higher concentrations of paclitaxel and no populations were observed in these plates (data not shown). No significant differences in cell growth were observed between HME-1 (100%) and CC (99.3 ± 18%; $p = 1$) or PSP cells (106 ± 36; $p = 0.8$).

Drug sensitivity of HME-1 cells, CC and PSP to different chemotherapeutic agents

We first compared drug sensitivity of PSP against CC and HME-1 cells. Results in Table I shows that PSP were more resistant to paclitaxel (mean ± SD IC_{50} for all PSP: 6.5 ± 3.3) than CC (mean ± SD IC_{50} for all CC: 4.1 ± 1.5; $p = 0.03$) and HME-1 cells (mean ± SD IC_{50}: 3.9 ± 2.5; $p = 0.02$). A more detailed analysis showed that 5 of 20 PSP (PSP1, PSP4, PSP16, PSP21 and PSP43) displayed significant resistance to paclitaxel (more than 2-fold compared to HME-1 cells) ranging from 2.1- to 3.8-fold (Table I). These PSP were considered as stably resistant to paclitaxel.

Expression of the mdr-1 gene and c-erbB2 protein in paclitaxel-surviving populations

Expression of the *mdr-1* gene was evaluated in HME-1, CC and PSP cells using RT-PCR. Only 2 of the 20 PSP expressed the *mdr1* gene (PSP1 and PSP4) (Fig. 1*a*). In reference to c-erbB2, none of the cell lines expressed this protein as detected by immunocytochemistry analysis (data not shown).

Detection of p21/WAF1 protein by western blot and immunofluorescence

We also analyzed the expression of proteins implicated in G2/M cell cycle checkpoint control at baseline and after treatment with γ-irradiation (6 Gy) at different time intervals. In HME-1,

TABLE I – SENSITIVITY PROFILES TO PACLITAXEL AND OCURRENCE OF P21/WAF1 MUTATIONS IN PACLITAXEL-SURVIVING POPULATIONS (PSP)

Cell line	Paclitaxel[1]	p21/WAF1 status	p21/WAF1 expression[2]
HME-1	3.9 ± 2.5	wt[3]	+
CC1	2.1 ± 0.02	wt	+
CC2	5.1 ± 1.3	wt	+
CC3	5.5 ± 2.4	wt	+
CC4	5.8 ± 2.2	wt	+
CC5	6 ± 0.5	wt	+
CC6	5.7 ± 1	wt	+
CC7	2.08 ± 0.1	wt	+
CC8	4.5 ± 0.5	wt	+
CC9	1.7 ± 0.3	wt	+
CC10	5.6 ± 2	wt	+
CC11	5.1 ± 1.1	wt	+
CC12	3.4 ± 1.8	wt	+
CC13	4.7 ± 2.2	wt	+
CC14	3.8 ± 1.7	wt	+
CC15	1.9 ± 0.01	wt	+
CC16	4.3 ± 2.3	wt	+
CC17	2.2 ± 1.2	wt	+
CC18	4.3 ± 0.9	wt	+
PSP1	13.8 ± 10.5	wt	+
PSP2	3.5 ± 1.7	wt	+
PSP3	5.3 ± 4	wt	+
PSP4	9.5 ± 6.7	wt	+
PSP6	4 ± 3.3	Mutated	−
PSP7	7.6 ± 2	wt	+
PSP8	6.4 ± 3.5	wt	+
PSP9	3 ± 0.8	Mutated	−
PSP16	8.4 ± 0.7	Mutated	−
PSP19	5.1 ± 3	Mutated	−
PSP20	7.3 ± 5.9	Mutated	+
PSP21	15 ± 10.5	Mutated	−
PSP22	5 ± 2.3	Mutated	−
PSP25	3.9 ± 1.6	Mutated	−
PSP32	4.1 ± 3.3	Mutated	−
PSP37	3.4 ± 0.9	Mutated	−
PSP38	4.7 ± 1.5	Mutated	−
PSP43	8.5 ± 6	Mutated	−
PSP45	4.2 ± 2.4	wt	−
PSP46	6.8 ± 0.8	Mutated	−

[1]Mean ± SD of IC_{50} values expressed in nM.–[2]Detected by Western blot using an antibody directed against the C-terminal of the protein.–[3]wt: wild-type.

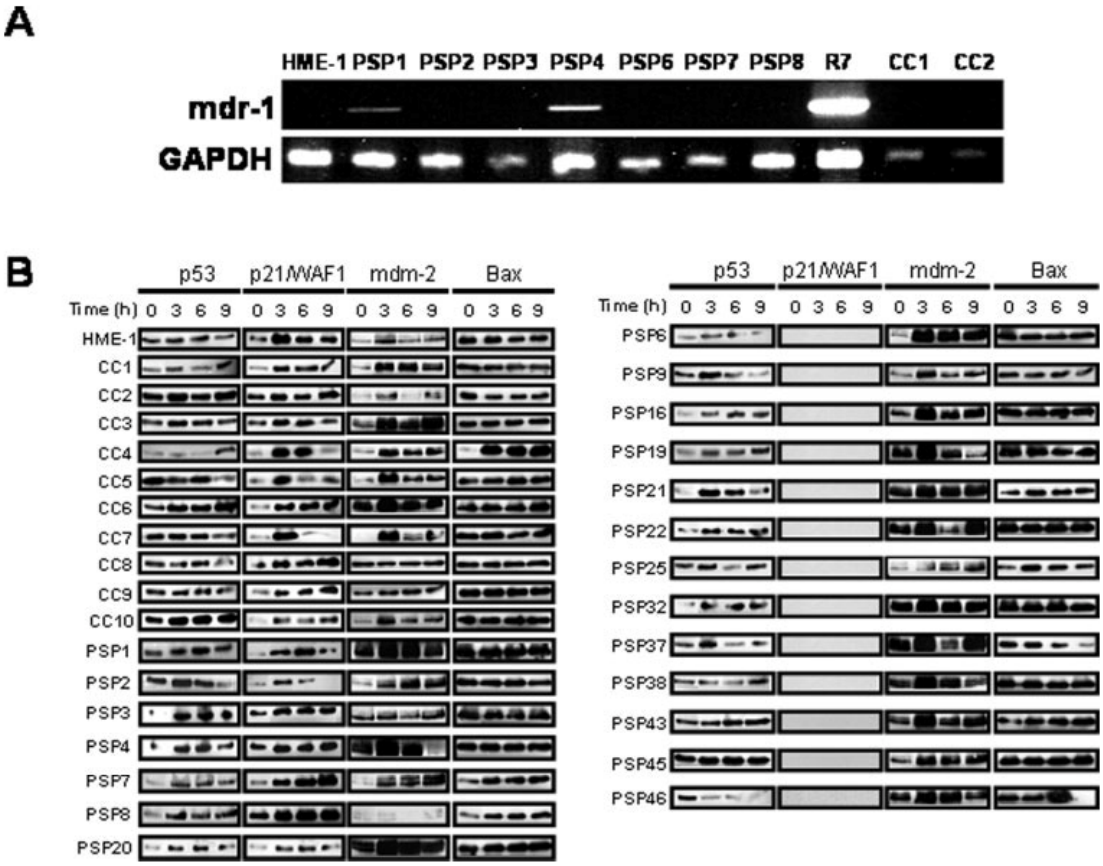


FIGURE 1 – (*a*) Representative gel showing the expression of the *mdr-1* gene by RT-PCR in HME-1 cells, 2 control clones (CC) and 7 paclitaxel-surviving populations (PSP). R7, a P-gp-expressing variant of the K562 cell line, was used as a positive control. (*b*) Protein kinetics of p53 and p53-related proteins (p21/WAF1, Mdm-2 and Bax) in HME-1 cells, CC and 20 PSP after γ irradiation (6 Gy) at different time intervals.

CC and 7 PSP (Fig. 1*b*), we observed p53 and p21/WAF1 accumulation in a time-dependent manner. Other p53-induced proteins (mdm-2 and bax) were also expressed at different levels. In contrast, using an antibody against the C-terminal region of the protein, no p21/WAF1 expression was detected in 13 PSP (Fig. 2*a*).

We then performed indirect immunofluorescence microscopy to assay for the presence of p21/WAF1 after doxorubicin treatment (100 nM). After 24 hr exposure, p21/WAF1 immunoreactivity of a C-terminal antibody was markedly increased in cell nucleus by drug treatment in HME-1 cells (Fig. 2*a*). Similar results were observed after drug treatment of CC and the 7 PSP that expressed p21/WAF1 in Western blot (data not shown). In contrast, no p21/WAF1 detection was observed in 13 PSP after drug treatment confirming the results from Western blots (a representative example of one of these PSP is shown in Fig. 2*a*).

Transcriptional alterations of CDKN1A/p21/WAF1 expression

To detect alterations in the *CDKN1A/p21/WAF1* transcription process, we examined its expression at the RNA level by Northern blot in HME-1, CC and PSP cells (Fig. 2*b*). We observed detectable *CDKN1A/p21/WAF1* RNA expression in almost all cell lines with the exception of PSP45.

CDKN1A/p21/WAF1 mutation analysis

Direct sequence analysis revealed sequence alterations in 13 PSP with respect to the wild-type sequence reported for the *CDKN1A/p21/WAF1* gene (Table I). The *CDKN1A/p21/WAF1* alteration was a T insertion in codon 104 resulting in a premature stop codon in position 127 of exon 2. Of interest, this mutation was present in PSP20 in which p21/WAF1 protein expression was detected using an antibody directed against the C-terminal region. Moreover, PSP45 cells were categorized as wt-*CDKN1A/p21/WAF1* gene. However, these cells did not show detectable levels of the protein by Western blot analysis. All CC expressed wt-*CDKN1A/p21/WAF1*. We also analyzed exons 4–9 of the p53 gene. No missense mutations were detected in HME-1, CC or PSP (data not shown).

Mutated-type allele specific PCR and RFLP-PCR

We then looked for a more sensitive method to detect the *CDKN1A/p21/WAF1* mutation in our cell lines. At first, we performed mutated-type allele specific PCR to discriminate between the wild-type allele of *CDKN1A/p21/WAF1* and the mutant allele. The presence of a given mutated allele could be verified by the presence of a specific band of 560 bp, after performing gel electrophoresis on PCR products. Allele-specific PCR revealed the presence of the mutated-type allele in 16 PSP (Fig. 2*c*). Moreover, the mutated-type allele was detected in PSP7, PSP8 and PSP45. Those PSP were found to carry the wild-type *CDKN1A/p21/WAF1* gene by sequencing analysis. No amplification product was observed when testing for the mutated allele on DNA from HME-1 cells, CC or PSP1, PSP2, PSP3 and PSP4 (Fig. 2*c*).

As the wild-type sequence around codon 104 defines a BsmfI site (recognition sequence GGGAC), which was abolished by the

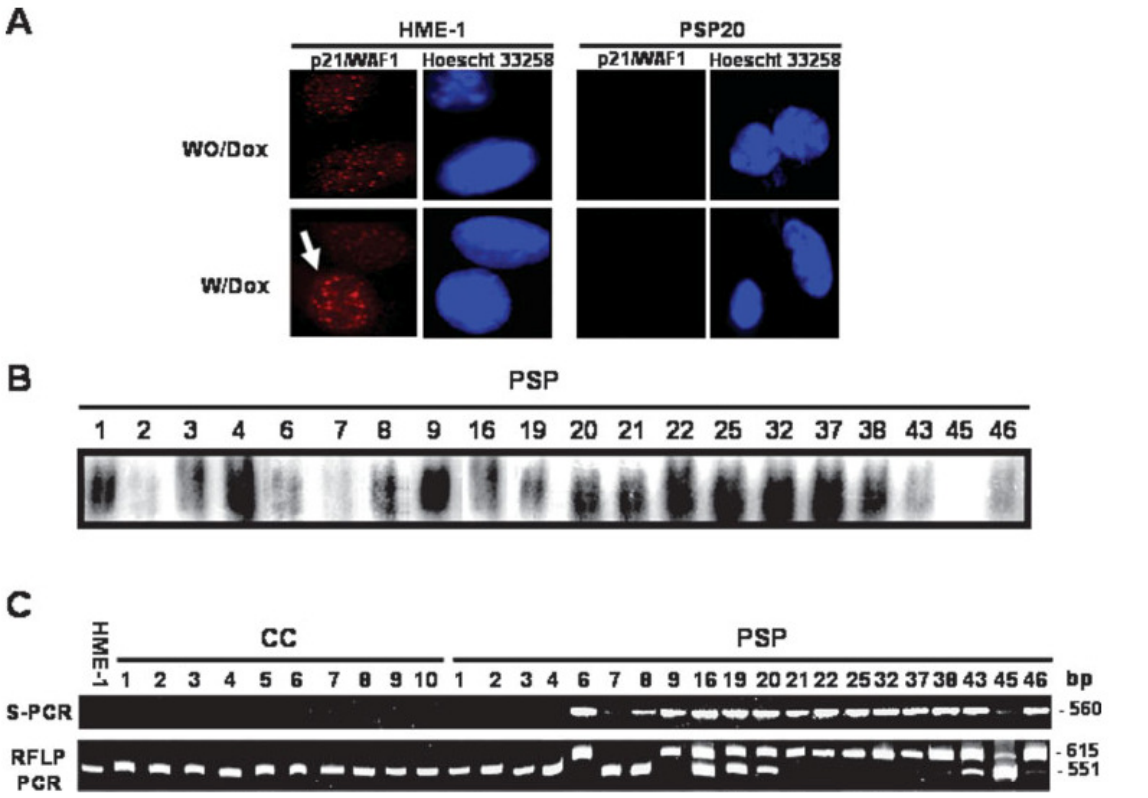


FIGURE 2 – (*a*) Representative examples showing the p21/WAF1 response to doxorubicin (Dox) 100 nM after 24 hr of treatment. Untreated (WO/Dox) or Dox-treated (W/Dox) HME-1 and PSP22 cells were stained with antibodies against C-terminal p21/WAF1 (red, TRITC) and DNA staining (blue, Hoescht 33258). The white arrows indicate the expression of p21/WAF1 in HME-1 cells. (*b*) Northern blotting showing the *CDKN1A/p21/WAF1* RNA levels in paclitaxel-surviving populations (PSP). (*c*) Detection of wild-type and mutated alleles of *CDKN1A/p21/WAF1* using allele-specific PCR (S-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) on isolated DNA from HME-1 cells, CC and PSP cells.

mutation (GGGAC became GTGGA), the presence of the mutation could be tested for by restriction analysis, using BsmfI on a PCR fragment of 615 bp comprising codon 104. Hence, the digestion of the wild-type DNA by BsmfI yielded 1 fragment of 551 bp, that of the mutant DNA 1 uncut fragment of 615 bp, whereas the heterogeneous were recognizable because of the concomitant presence of the 551 and the 615 bp bands. Results shown in Figure 2*c* demonstrated that 7 PSP presented only the uncut 615 bp band indicating the presence of the *CDKN1A/p21/WAF1* mutation. Seven PSP presented both fragments indicating the presence of a heterogeneous state. Finally, 6 PSP as well as HME-1 and CC clones presented only the 551 bp fragment after BsmfI digestion confirming the presence of wild type *CDKN1A/p21/WAF1* gene.

Detection of C-terminal-truncated p21/WAF1 protein by western blot and immunofluorescence

We performed immunoblotting analysis using monoclonal antibodies directed against the N-terminus of the p21/WAF1 protein, which is conserved in the C-terminal-truncated-p21/WAF1 protein (Fig. 3*a*). Expression of a migrating band corresponding to wt-p21/WAF1 protein indicated that the N terminus was intact in HME-1, CC and 12 PSP cells. Interestingly, Western blot analysis revealed also a faster-migrating band protein in 13 PSP. This 14 kDa band corresponding to the C-terminal-truncated-p21/WAF1 protein was detected as a single signal in 7 PSP. Moreover, this band was coexpressed with wt-p21/WAF1 in 6 PSP clones. No p21/WAF1 protein expression was detected in PSP45.

We further examined the intracellular localization of p21/WAF1 and C-terminal-truncated-p21/WAF1 protein using monoclonal antibodies directed against the N-terminus. These experiments were performed in representative examples of the entire population as following: cells expressing wt-p21/WAF1 (HME-1 cells, CC1 and PSP1), cells expressing the C-terminal-truncated-p21/WAF1 (PSP6) or cells expressing no p21/WAF1 cells (PSP45) (Fig. 3*b*). As expected, p21/WAF1 was predominantly localized in the nucleus of HME-1 cells, after treatment with doxorubicin (100 nM). Similar results were observed in CC1 and PSP1 cells (data not shown). In contrast to HME-1 cells, 24 hr after treatment with doxorubicin (100 nM), p21/WAF1 staining did not accumulate in the nucleus and was observed only in the cytoplasm of PSP6. Finally, when examined the intracellular localization in PSP45, p21/WAF1 was virtually absent in these cells after drug treatment.

Detection of the CDKN1A/p21/WAF1 mutation in HME-1 cells

To establish whether the *CDKN1A/p21/WAF1* mutation was present in a minor population of parental HME-1 cells, one 75-cm^2 tissue culture flask was seeded with HME-1 cells at low density and allowed to grow to near confluence (~70%). Then, cells were seeded into 2 separate 96-well plates at a concentration of 100 cells per well and allowed to grow to near confluence. Cells were recovered and specific PCR for *CDKN1A/p21/WAF1* mutation was performed as described in the Material and Methods section. Of 61 propagated colonies, none of them displayed the band corresponding to the 560 bp amplification product. Mutation allele-specific PCR did

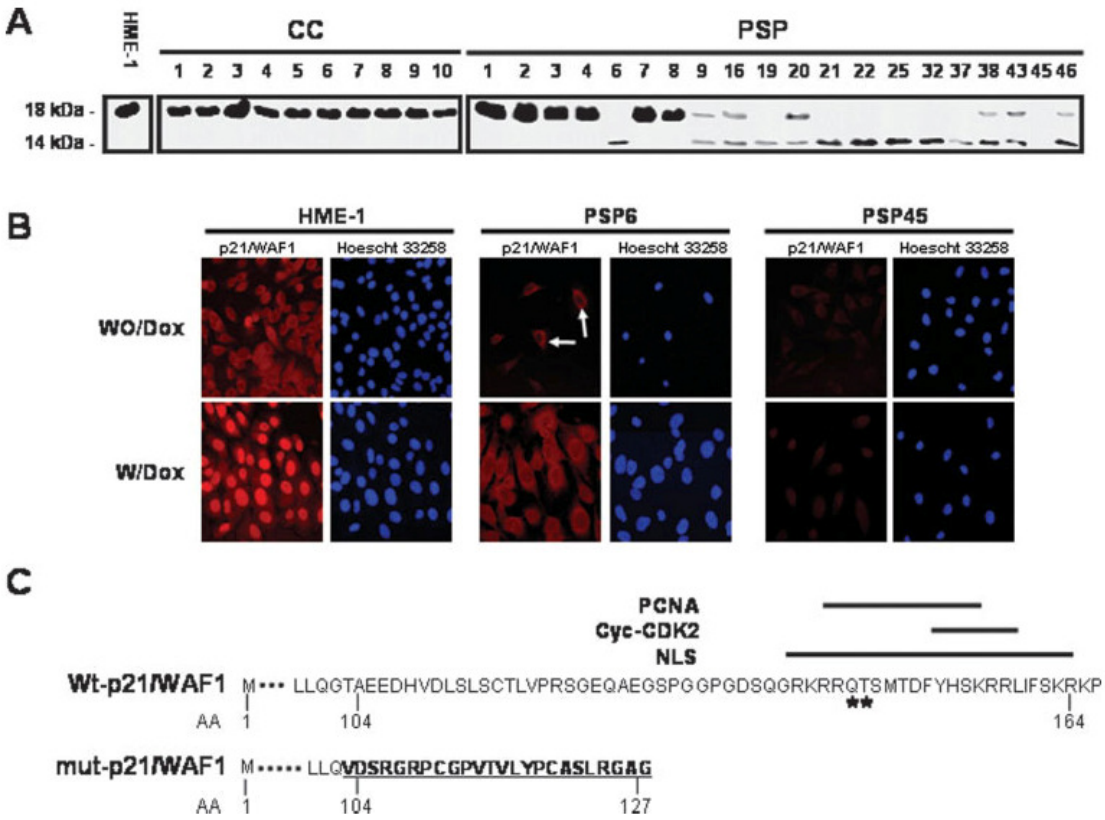


FIGURE 3 – (*a*) Western blot analysis of p21/WAF1 protein using a monoclonal antibody directed against the N-terminus of the protein. (*b*) Representative examples showing the p21/WAF1 cellular localization before and after treatment with doxorubicin (100 nM; 24 hr). Cells were processed for double immunofluorescence labeling with antibodies against N-terminal region of p21/WAF1 (red, TRITC) and DNA staining (blue, Hoescht 33258). The white arrows indicate the cytoplasmic expression of p21/WAF1 in PSP6 cells. (*c*) Schematic diagrams of wild-type and C-terminal-truncated p21/WAF1 proteins. The positions of the nuclear localization sequence (NLS), PCNA binding region, cyclin binding region and C8 α-subunit of the 20S proteasome are indicated in the wild-type p21/WAF1 sequence. The AKT-phosphorylation sites are represented by **.

not reveal the presence of the mutated-type allele in HME-1 parental cells in any of 61 propagated colonies (data not shown).

Discussion

The present work shows that stringent selection of the immortalized breast epithelial cell line HME-1 with paclitaxel (10 pM) in a 7-day drug exposure results in the establishment of a subset of surviving cell populations bearing a mutation of the *CDKN1A/p21/WAF1* gene (80% of PSP). This mutation favors the appearance of a 14 kDa form that reacts with antibodies raised against the N-terminal region, but not with antibodies raised against the C-terminal region of p21/WAF1. Moreover, the C-terminal-truncated p21/WAF1 protein was distinct from full length p21/WAF1 in the respect that they had different pattern of nuclear–cytoplasm localization.

p21/WAF1, a universal inhibitor of the cyclin-dependent kinases, is a regulator of cellular responses to microtubule damage induced by paclitaxel.[5,6] It is believed that p21/ WAF1 participates directly in the regulation of mitotic exit after microtubule damage induced by paclitaxel, *via* an action on the CDK1/cyclin-B complex.[7,8] Alterations in the expression or function of the p21/WAF1 gene thus may affect response to paclitaxel treatment.

Deletions or mutations of the *p21/WAF1* gene were reported to be rare in human tumors. In breast cancer patients, Balbin reported a tumor-specific alteration in one patient corresponding to a C–T transition in codon 94, which caused the substitution of a tryptophan for an arginine.[9] In another series of 85 primary breast tumors, McKenzie reported 2 primary tumors that contained tumor-specific missense mutations in the *CDKN1A/p21/WAF1* gene.[10] Mutations of *CDKN1A/p21/WAF1* gene have been also reported in human tumor cell lines[11] and in samples of patients with other tumor types.[12 14]

In our study, the p21/WAF1 mutation was characterized by a T insertion in codon 104 resulting in the appearance of a premature stop codon in position 127 of exon 2. As shown in Figure 3*c*, the mutant protein has lost the PCNA binding region (residues 133–164), the weak cyclin-binding region (residues 152–158), the nuclear localization signal (residues 140–156), as well as the Akt-phosphorylation sites (residues 145–146).[15] The C-terminal-truncated protein also showed a replacement of the amino acid sequence from G104 into VDSRGRPCGPVTVLYPCASLRGAG.

Other authors have reported the presence of p21/WAF1 C-terminal mutants in normal and cancer cells. Poon *et al.* and Tchou *et al.* have described a 19 kDa form of p21/WAF1 (p21Δ) in the cytoplasm of UV-irradiated normal diploid fibroblasts and of TPA/phorbol ester-treated Calu-1 and A549 cells.[16,17] This form of p21/WAF1 was probably derived from p21/WAF1 by proteolytic cleavage removing around 10 amino acids from the C-terminus and could not be detected by C-terminal-directed p21/WAF1 antibodies. Similarly to our C-terminal-truncated p21/WAF1 protein, p21Δ localized in the cytoplasm due to insufficient signals

for nuclear localization.[16] Many transformed human cell lines contained the majority of p21/WAF1 in the p21Δ form.[16]

An immediate question was whether the *CDKN1A/p21/WAF1* gene mutation was preexistent in the cell line or whether it was induced by paclitaxel treatment. To address this point, HME-1 parental cells were subjected to a *CDKN1A/p21/WAF1* mutation search. Using a mutation allelle-specific PCR and subcloning of HME-1 cells, we were unable to detect the mutation in the parental cells. This could be due to a lack of sensitivity of this technique. In our opinion, the mutation arose randomly during the history of these cells rather than being induced by paclitaxel exposure. In fact, agents such as paclitaxel are not thought to cause point mutations, and it would be unlikely that this agent would be directly responsible for the 104 codon mutation observed in our PSP. Thus, paclitaxel could select cells with this preexisting mutation.

These results could indicate that p21/WAF1 plays an important role in the cellular response to paclitaxel treatment. In fact, we observed that although the *CDKN1A/p21/WAF1* gene mutation did not confer any cell growth advantage, it conferred a great survival advantage in the presence of paclitaxel. Thus, it is likely to envision C-terminal-truncated p21/WAF1 expression as an intermediate step, which establishes a p21/WAF1 pseudo-null state permissive to "paclitaxel-resistance," which in turn leads to a "fixed drug resistant phenotype" selected after drug treatment. Our results in PSP show a gradual evolution from a wt-p21/WAF1 state to a fully mutated status. Moreover, the intermediary phase observed in some PSP clones, where both the normal and mutated alleles can be detected, could correspond to the evolution from a predominant wt-p21/WAF-1 population to the outgrowth of a predominant C-terminal-truncated p21/WAF1 population. These observations fit with a model of clonal expansion of cells bearing a given set of alterations during drug exposure. These are reminiscent of the conventional thinking about the selection of drug resistant sublines, which dictates that a change found after drug selection directly contributes to the drug resistance phenotype.

Of interest, PSP45 presented another mechanism which resulted in a p21/WAF1-null status. These cells appeared to bear the mutant form of p21/WAF1 as Northern blot and Western blot analyses did not show any signal when screening for the wild-type p21/WAF1 in these cells. However, DNA sequencing revealed only the presence of wild-type alleles. Mutated-type allele-specific PCR and RFLP-PCR confirmed the heterogeneous status of these cells as they detected both wild-type and mutated-type allele. These results indicate that the absence of RNA and protein expression could be caused by reduced expression of the remaining *CDKN1A/p21/WAF1* wild-type allele. In breast cancer cells, the principal mechanisms to explain *CDKN1A/p21/WAF1* gene silencing include *p53* gene mutations, *c-erbB2* gene amplification or epigenetic alterations such as hypermethylation and/or deacetylation of the *CDKN1A/p21/WAF1* gene.[18–20] None of these genetic or epigenetic alterations were presented in PSP45 (data not shown). In this subline, thus, absence of expression of *CDKN1A/p21/WAF1* mRNA and protein could be ascribed to mutations in the gene promoter.

As discussed earlier, the appearance of PSP bearing the *CDKN1A/p21/WAF1* mutation was indicative of a strong growth and selective survival advantage of this mutation during treatment with paclitaxel in breast epithelial nontransformed cells. It was reported that cytoplasmic p21/WAF1 plays an important role in protecting cells against chemical-induced apoptosis. For instance, Asada *et al.* demonstrated that a deletion mutant of p21/WAF1 lacking the nuclear localization signal (ΔNLS-p21/WAF1) also led to an apoptosis-resistant phenotype, mediated by binding to and inhibition of the stress-activated ASK1 activity.[21] However, our growth inhibition assays in the presence of paclitaxel showed that only 3 (15%) of the 13 PSP bearing the C-terminal-truncated p21/WAF1 protein were stably resistant to paclitaxel.

In our experiment, 2 of the 20 paclitaxel-surviving populations displayed increased mRNA levels of the *mdr-1* gene. Both PSP clones expressed wt-*p21/WAF1* gene and were stably resistant to paclitaxel. Thus, overexpression of *mdr-1* gene accounts for 10% of the resistance mechanisms to paclitaxel in this setting. Our data show that short-term exposure to paclitaxel can influence *mdr-1* gene expression and the development of the MDR phenotype in noncancerous breast epithelial cells. The last 5 PSP (25% of surviving populations) showed neither the presence of *p21/WAF1* mutations nor the expression of the *mdr-1* gene. These PSP presented an unstably resistant phenotype to paclitaxel as determined by growth inhibition assay. The growth and selective advantage of these PSP during the selection process could be attributed to other mechanisms of resistance to paclitaxel, such as alterations in the composition and dynamics of microtubules.[22] These alterations were not explored in this work.

In conclusion, the present study demonstrates that paclitaxel selects noncancerous breast epithelial cells harboring a *CDKN1A/p21/WAF1* mutant. It would be of interest to investigate whether the C-terminal-truncated-p21/WAF1 protein described herein expressed different functions than wt-p21/WAF1 and if so, whether these functions could confer a survival advantage to mutant cells after paclitaxel treatment. These experiments are currently being developed in our laboratory. Finally, since paclitaxel is actually used in the adjuvant setting for the treatment of breast cancer, these 20 PSP should be valuable tools to understand the development of paclitaxel resistance phenomena and paclitaxel-induced alterations in noncancerous epithelial breast cancer cells.

References

1. Nabholtz JM, Vannetzel JM, Llory JF, Bouffette P. Advances in the use of taxanes in the adjuvant therapy of breast cancer. Clin Breast Cancer 2003;4:187–92.
2. Erman M, Baltali E, Karaoglu A, Abali H, Engin H, Ozisik Y, Guler N, Altundag K, Tekuzman G, Atahan IL, Onat D, Sayek I. A phase II study on the safety and efficacy of 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide (FEC) followed by paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. Cancer Invest 2005;23:215–21.
3. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, Wickerham DL, Yothers G, Soran A, Wolmark N. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. J Clin Oncol 2005;23:3686–96.
4. Galmarini CM, Falette N, Tabone E, Levrat C, Britten R, Voorzanger-Rousselot N, Roesch-Gateau O, Vanier-Viornery A, Puisieux A, Dumontet C. Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity. Br J Cancer 2001;85:902–8.
5. Heliez C, Baricault L, Barboule N, Valette A. Paclitaxel increases p21 synthesis and accumulation of its AKT-phosphorylated form in the cytoplasm of cancer cells. Oncogene 2003;22:3260–8.
6. Mantel C, Braun SE, Reid S, Henegariu O, Liu L, Hangoc G, Broxmeyer HE. p21(cip-1/waf-1) deficiency causes deformed nuclear architecture, centriole overduplication, polyploidy, and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells. Blood 1999;93:1390–8.
7. Bates S, Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. Oncogene 1998;17:1691–703.
8. Barboule N, Chadebech P, Baldin V, Vidal S, Valette A. Involvement of p21 in mitotic exit after paclitaxel treatment in MCF-7 breast adenocarcinoma cell line. Oncogene 1997;15:2867–75.
9. Balbin M, Hannon GJ, Pendas AM, Ferrando AA, Vizoso F, Fueyo A, Lopez-Otin C. Functional analysis of a p21WAF1,CIP1,SDI1 mutant (Arg94–> Trp) identified in a human breast carcinoma. Evidence that the mutation impairs the ability of p21 to inhibit cyclin-dependent kinases. J Biol Chem 1996;271:15782–6.
10. McKenzie KE, Siva A, Maier S, Runnebaum IB, Seshadri R, Sukumar S. Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations. Clin Cancer Res 1997;3:1669–73.
11. Bhatia K, Fan S, Spangler G, Weintraub M, O'Connor PM, Judde JG, Magrath I. A mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma. Cancer Res 1995;55:1431–5.
12. Gao X, Chen YQ, Wu N, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV. Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. Oncogene 1995;11:1395–8.

13. Lacombe L, Orlow I, Silver D, Gerald WL, Fair WR, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Analysis of p21WAF1/CIP1 in primary bladder tumors. Oncol Res 1996;8:409–14.
14. Ibrahim SO, Lillehaug JR, Dolphine O, Johnson NW, Warnakulasuriya KA, Vasstrand EN. Mutations of the cell cycle arrest gene p21WAF1, but not the metastasis-inducing gene S100A4, are frequent in oral squamous cell carcinomas from Sudanese toombak dippers and non-snuff-dippers from the Sudan, Scandinavia, USA and UK. Anticancer Res 2002;22:1445–4.
15. Dotto GP p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta1471:M43–56, 2000.
16. Poon RY, Hunter T. Expression of a novel form of p21Cip1/Waf1 in UV-irradiated and transformed cells. Oncogene 1998;16:1333–43.
17. Tchou WW, Rom WN, Tchou-Wong KM. Novel form of p21(WAF1/CIP1/SDI1) protein in phorbol ester-induced G2/M arrest. J Biol Chem 1996;271:29556–60.
18. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177–82.
19. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. Cell 1992; 70:523–6.
20. Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:6785–90.
21. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. Embo J 1999;18:1223–34.
22. Galmarini CM, Kamath K, Vanier-Viornery A, Hervieu V, Peiller E, Falette N, Puisieux A, Ann Jordan M, Dumontet C. Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. Br J Cancer 2003;88: 1793–9.

12.4. Annexe 4 : article de synthèse 1

Sous presse à *Current Cancer Drug Targets*

Tubulin folding pathways: implication in the regulation of microtubule dynamics

A.Beghin*, CM Galmarini* & C.Dumontet*

* INSERM U590 and Laboratoire de Cytologie Analytique, Université Lyon 1, France
Corresponding author: A.Beghin INSERM 590 Faculté de Médecine Rockefeller 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France Email : beghinanne@recherche.univ-lyon1.fr Tél : (+33) 04 78 77 72 36 Fax : (+33) 04 78 77 70 88
Key words: Tubulin folding, microtubule dynamics, aneuploidy, tubulin binding agents

Abstract

As microtubules are essential in many cell functions, they have been used as a target of a variety of anticancer drugs which are grouped in stabilizing (taxanes) and destabilizing (vinca-alkaloids, colchicinoids) microtubule agents. It appears clearly now that the dynamic behaviour more than modifications of microtubule mass are altered by antitubulin agents in the range of serum concentrations obtained after administration in humans. While implication of microtubule associated proteins in the regulation of microtubule dynamics has been extensively studied, there is a growing body of data suggesting that tubulin folding could also play an important role in microtubule dynamics. We review the current knowledge regarding tubulin folding pathways, their relation to disease, and their possible influence on microtubule dynamics.

Introduction

Microtubules (MT) constitute one of the major components of the cytoskeleton of eukaryotic cells and are involved in many essential processes, including cell division, ciliary and flagellar motility and intracellular transport. These many roles make MT essential to the life of all eukaryotic cells. These critical functions along with their fascinating biophysical properties and dynamics have made MT interesting to scientists from many disciplines who have sought to understand the mechanisms that are involved in MT functions in the cell. In animal cells, mitosis requires the presence of a unique organelle: the mitotic spindle, which plays an essential role in the maintenance of euploidy. The assembly and function of the mitotic spindle, required for adequate chromatide segregation, includes a complex series of temporally and spatially linked events. Most cancer cell lines are aneuploid and display CIN (chromosomal instability), whereas the majority of non tumor cells lines are diploid and do not display CIN. It is also important to note that chromosomal instability occurs early in malignant tumors [1] [2], suggesting that CIN is not simply a late consequence of aneuploidization. Many authors have suspected a role of aneuploidy in tumorogenesis [3-7]. A possible mechanism for generating aneuploidy involves acquisition of a permanent defect in the ability to segregate chromosomes in a tumor progenitor cell. This would lead to an endoreplication or an abortive cell cycle, which are the the principal causes of polyploidy, or persistent changes in chromosome number at each cell division. Deficiency in chromosome segregation

can be due to several mechanisms (for example : kinetochore attachement, chromatide separation and migration). Most of these mechanisms share common properties: the MT and its dynamic behaviour. It is now clear that modifications of dynamic properties of MT can give rise to abnormal mitotic spindle formation and to the inability to properly segregate chromosomes, thereby leading to aneuploidy, and possibly tumor formation. MT have been used as a target of a variety of anticancer drugs which are grouped in stabilizing (taxanes) and destabilizing (vinca-alkaloids, colchicinoids) MT agents. Jordan et al. have reviewed the mechanisms of action of these antitumor drugs that interact physically with MT and tubulin [8]. It appears clearly now that the dynamic behaviour more than modifications of MT mass are altered by antitubulin agents in the range of serum concentrations obtained after administration in humans. By analogy, alterations of cellular components that affect MT dynamics could contribute to spindle malfunction. Tubulin folding, post-translational modifications and MT stabilizing and destabilizing proteins are processes known to act post-translationnally to regulate tubulin pools, characteristics or function. While the latter two types of processes have been widely explored, there are few data addressing the effect of tubulin folding on MT dynamics.

Regulation of tubulin pool content

Tubulin peptide synthesis

Total cellular tubulin pools are subject to complex regulations. Cleveland *et al.* found a decrease of α-tubulin mRNA in response to treatments that increase tubulin monomers [9]. They have found that in many, but not all, cell types tubulin synthesis decreases very rapidly in response to microtubule inhibitors that increase the monomer pool It has also been shown that the beta-tubulin RNAs are selectively targeted as substrates for destabilization not through the recognition of specific RNA sequences, but rather through co-translational recognition of the amino-terminal beta-tubulin tetrapeptide after its emergence from the ribosome [10]. Furthermore each tubulin isotype peptide is coded by a different gene possessing its own promoter sequence. These isotypes have been shown to undergo different post-translational modifications and displays a different level of stability [11]. Finally, free tubulins are subject to degradation via proteasome. Wang et al. have shown that misfolded tubulin is rapidly degraded by the proteasome, resulting in a large decrease in cellular tubulin content [12].

Tubulin folding

Molecular chaperones protect target proteins against aggregation and proteasome destruction and are involved in the folding of immature proteins. *In vitro* overexpression of individual tubulin subunits, in either prokaryotic or eukaryotic systems, results in protein aggregation. Furthermore, tubulin molecules possess a variety of “interacting surfaces” and we can hypothesize that these should be preserved from unwanted interactions during folding. It appears that the different tubulin isotypes share a common folding pathway. Tubulin folding and the formation of polymerization-competent αβ tubulin heterodimers is a complex process (figure 2) that requires the sequential actions of prefoldin, during the translation process [13], followed by the 800 kDa cytosolic chaperonin CCT (cytosolic containing TCP-1) [14, 15], and lastly the interactions with five TBC (Tubulin Binding Cofactors) termed TBCs A-E [16-18]. The role of prefoldin is to allow the formation of a complex between tubulin and CCT. Upon ATP-ADP exchange, the chaperonin CCT

undergoes an allosteric conformational change [14]. After this step, TBCA and –B bind respectively to β and α tubulin peptides in order to constitute soluble pools of monomers [16]. TBCD and E can bind to tubulin peptides generated by the TBCA and B complex or directly from tubulin-CCT complexes. TBCD interacts with β tubulin and TBCE binds to α subunit. Once TBCDβ tubulin and TBCE-α tubulin complexes are formed, "native" tubulin heterodimers are released in presence of TBCC, GTP, and magnesium and possess a tri-dimensional conformation required for MT polymerization [19]. The hydrolysis of GTP serves as a switch for the release of the native tubulin heterodimer from a supercomplex containing TBCC, -D, -E and α- and β-tubulin. TBCD and TBCE can also bind to β and α tubulin of native heterodimers and induce the dissociation of the heterodimer. In addition, TBCC, D and -E can interact with native tubulin heterodimers to reform the supercomplex TBCC/-D/-E/αβtubulin [18]. This cycle (termed back-reaction) is thought to constitute a quality control mechanism that serves to continuously monitor the guanine nucleotide hydrolytic activity of β-tubulin in the heterodimer. The biological significance of this process, called tubulin GTP Activating Protein (GAP) activity, lies in the fact that the ability of β-tubulin to hydrolyze GTP is an essential property for the proper functioning of MT dynamics. These observations raise the possibility that the tubulin folding chaperones act not only in the biosynthesis of functional tubulin heterodimers but are also involved in the final step of tubulin unfolding and degradation, a potential means of modulating MT dynamics.

Prefoldin

Eukaryotic prefoldin (PFD) is a heterohexameric chaperone with a jellyfish-like structure whose function is to deliver non-native target proteins, principally actins and tubulins, to the eukaryotic cytosolic chaperonin for facilitated folding. Simons et al. have showed that the tips of the PFD tentacles are required to form binary complexes with target proteins. PFD seems to use the distal ends of sets of subunits to form stable binary complexes with different target proteins such as actin and α- and β-tubulin. [20].

Cytosolic chaperonin containing t-complex polypeptide 1

Several studies [21] [22] implicate the participation of cytosolic chaperonin in the facilitated folding of actin and tubulin (for review see [15]). Cytosolic chaperonin is the functional homolog of GroEL in the cytosol of eukaryotes. Cytosolic chaperonin is assembled from eight different polypeptides. Rommelaere et al. have demonstrated that one of these is t-complex polypeptide 1 (TCP-1), while the other seven are TCP-1related polypeptides, implicating the existence of a multigene family of TCP-1 homologues. They provided evidence that the TCP-1 ring complex can facilitate the folding of both actin and tubulin [14]. The chaperonin would release its bound polypeptide into the central cavity upon *ADP/ATP* exchange and hydrolysis, allowing correct folding. Ultimately, since hydrophobic surfaces are typically buried in native proteins, the correctly folded protein would be discharged from chaperonin into free solution. The facilitated folding of the GTP-binding proteins α- and β-tubulin requires cytosolic chaperonin and additional protein cofactors described below. When a cytosolic chaperonin-mediated α- or β-tubulin folding reaction occurs in the presence of ATP and GTP but without cofactors, the target protein is released in a non native form that can be captured by other chaperonin molecules: for example, the inclusion of excess mitochondrial chaperonin in such reactions results in the bulk transfer of

labeled tubulin target protein to mitochondrial chaperonin [23].

TBCA

TBCA was the first tubulin TBC discovered. A recent report in which the expression of TBCA was analyzed in murine tissues demonstrated how this protein is more abundantly expressed in testis, where it appears to be associated with β-tubulin processing through spermatogenesis [24]. Homologues of TBCA in *S.Cerevisiae,* Rbl2p [25, 26] and in *S. pombe,* Alp31 [27], have been identified. Rbl2p, which has 20% identity with TBCA (table 1), was identified as a protein capable of rescuing cells from lethal β-tubulin overexpression, as well as being required for normal meiosis [26]. Interestingly, nocodazole treatment used to arrest *S.cerevisiae* cells in the G2/M phase upregulated Rbl2 expression [28]. Alp31 is required for proper control of growth polarity and seems to be involved in the integrity of cytoplasmic MT [27].

TBCB

TBCB was the fifth mammalian tubulin folding TBC identified [29]. TBCB has also been found to have homologues in *S.cerevisiae,* Alf1p [30] and in *S. Pombe,* Alp11 [27]. The three homologous cofactors contain the CLIP170 domain also found in several MAPs, suggesting that this domain could represent a MT binding domain [29, 30]. Alf1p is able to associate with both nuclear and cytoplasmic MT *in vivo,* this localization being dependent on the CLIP170 domain. While overexpression of Alf1p has no effect in wildtype strains, a null mutation of yeast TBCB is lethal in combination with an α-tubulin mutation [29]. Overproduction of Alf1p results in abnormal association of this protein with tubulin heterodimers in *S cerevisiae.* The *S. pombe* homologue Alp11 is essential for cell viability and its overproduction results in cell lethality [27].

TBCC

TBCC is capable of inducing the release of native αβ-heterodimer from the TBCD/β-tubulin/TBCE/α-tubulin complex. In mammals, TBCC contains a hypothetical bipartite nuclear targeting sequence, a leucine zipper, and three different clusters of cysteine, proline, and tryptophane residues that are probably involved in protein–protein interactions. Although homologues of TBCC have not yet been described in *S. pombe,* recent searches have detected its presence in the *S. pombe* database and Cin2p has been identified as a possible homologue candidate of this protein in *S. Cerevisiae* [31]. This latter TBCC homologue has been shown to play a role in tubulin dimer formation [32]. The retinitis pigmentosa 2 protein (RP2) is expressed in a wide variety of tissues and contains an N-terminal region with similarity to the C-terminal half of tubulin cofactor C (TBCC) (30%identical, 44% similar). Similar to TBCC, RP2 can stimulate the GTPase activity of tubulin in the presence of additional cofactors in vitro [33].

TBCD

Tian *et al.* purified a protein of 130 kDa that behaved under gel filtration conditions as a dimer with a molecular mass of about 300 kDa [16]. TBCD can capture β-tubulin in TBCD/β-tubulin complexes by disrupting tubulin heterodimers *in vitro* [15]. *In vivo,* the

overexpression of TBCD in HeLa cells [34] leads to a complete destruction of the MT network. Immunolocalization of TBCD and β-tubulin showed that both proteins colocalized in the cells, while the α-tubulin subunit appeared to be rapidly eliminated, most probably via proteasome degradation. Although TBCD was not seen to bind to

MT [34], either via immunocytochemistry or copolymerization experiments, one cannot rule out the possibility that this protein could bind to MT ends. Different authors have shown that TBCD, although it does not co-polymerize with MT either *in vivo* or *in vitro*, modulates MT dynamics by sequestering β-tubulin from GTP-bound αβ-heterodimers [34]. Homologues of TBCD have also been identified in *S.cerevisiae,* Cin1p [35]and in *S.pombe,* Alp1 [36]. Cin1p is a protein involved in chromosome segregation that is also required for MT stability. Overproduction of this TBCD homologue through the activation of an inducible promoter resulted in increased sensitivity to benomyl, leading to a loss of MT function [36]. In *S.pombe*, a temperature-sensitive alp1 mutant shows a variety of defects including abnormal mitoses, loss of MT structures, displacement of the nucleus, altered growth polarity and asymmetrical cell division. Overexpression of Alp1 is lethal in wild-type cells, resulting in altered cell shape, but is rescued by co-overexpression of β-tubulin. Alp1 co-localizes with MT, both in interphase arrays and in mitotic spindles. Furthermore, Alp1 binds to and co-sediments with paclitaxel-stabilized porcine MT. These results suggest that, in addition to a function in the folding of beta-tubulin, TBCD may play a vital role in MT-dependent processes as a MT-associated protein.

TBCE

TBCE binds to α-tubulin after it has been released from the cytosolic chaperonin. Although the exact mechanism for the binding of this TBC to α-tubulin is still unknown, different experiments in HeLa cells have shown that overexpression of TBCE can also
destroy the complete MT network of the cell [31]. Copolymerization experiments carried out with purified brain tubulin and *in vitro* translated TBCE have failed to show the presence of TBCE associated with MT. Homologues of TBCE have also been identified in *S. cerevisiae,* Pac2p [37] and in *Sc. pombe,* Alp21 [36], also known as Sto1 [38]. Pac2p is required for normal MT stability and, when overexpressed in *S.cerevisiae* together with Tub1p (α-tubulin), a complex of these two proteins can be detected [39]. Sto1 is an essential gene in *S.pombe* as it is involved in the generation of normal MT and mitotic spindle. The interphase MT cytoskeleton in sto1-Δ cells is severely disrupted, and as cells enter mitosis their spindles fail to form. After a transient arrest with condensed chromosomes, the cells exit mitosis and resume DNA synthesis, where they separate abnormally and die.

E-like protein

Based on sequence similarity, a novel protein similar to cofactor E, E-like protein (El) was identified [40]. In overexpression experiments El appears to disrupt functional dimers and target them for destruction by the proteasome. El apparently does not interact with microtubules directly and has no function in the tubulin folding pathway. Suppression of El expression seems to increase the cellular content of stable, posttranslationally modified microtubules by an unknown mechanism [40].

Tubulin folding related diseases

In neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, cytoskeletal proteins are deficient and aggregated. Schuller et al. have provided evidence for a mechanism of microtubular accumulation involving t-complex polypeptide 1 in Alzheimer's disease and in related diseases such as Down's Syndrome [41]. Another study has extended observations of distinct expression patterns of molecular chaperones in Down Syndrome brain and discussed the relevance of aberrant TCP-1 expression patterns in the early stage development of brain in Down's Syndrome [42]. Mutilating sensory

neuropathy with spastic paraplegia is a very rare disease with both autosomal dominant and recessive modes of inheritance. A mutation in the Cct4 gene encoding the CCT delta subunit has been reported to be associated with autosomal recessive mutilating sensory neuropathy in mutilated foot (mf) rat mutant [43]. A mutation in the Cct5 gene encoding the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (CCT) has been identified in patients with mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia [44]. This is the first disease causing mutation that has been identified in the human CCT subunit genes; the mf rat mutant could serve as an animal model for studying these chaperonopathies. TBCE seems also to be involved in certains neuropathies (for review see *[45]*). Mutations in TBCE lead to HRD (hypoparathyroidism, mental retardation and facial dysmorphism) syndrome and Sanjad–Sakati syndrome, as well as to autosomal recessive Kenny–Caffrey syndrome (AR-KCS)[46]. Mutations in TBCE in mice lead to a progressive motor neuropathy [47]. RP2 protein, similar in sequence to TBCC, is mutated in patients with a form of X-linked retinitis pigmentosa (XL-RP), a progressive degeneration of the retina [48]. Moreover, a conserved arginine residue mutated in RP2 in XL-RP patients abolishes this function.

Regulation of Tubulin Cofactor action: the role of Arl2 and PP2A

The ADP-ribosylation factor (Arf) family of monomeric, regulatory GTPases is comprised of as many as 23 members in mammals and can be divided into the Arf and Arf-like (Arl) proteins [49]. While the Arfs share a number of conserved activities and >60% sequence identity, the Arls are more divergent in both sequence (40-60% identity to each other or to any Arf) and function. For example, Arl2 shares 45% identity to Arf1 yet lacks any of the biochemical activities previously ascribed to Arfs [50]. Arl2 is notable for a number of unusual features within the ARF family, including the apparent lack of N-terminal myristoylation [51], rapid and phospholipid-independent binding of GTP, and association with mitochondria [52]. Binder of Arl2 (BART; 20 kDa), the first Arl2 effector described, binds to Arl2·GTP with high affinity (Kd~20 nM) and also partially localizes to mitochondria [52]. The BART·Arl2·GTP complex can bind to the inner mitochondrial membrane protein, adenine nucleotide transporter 1 (ANT1), in *in vitro* assays. Only 5-10% of bovine brain Arl2 is fractionated with mitochondria, the rest appearing in the cytosol [52]. In contrast to these data implicating a role for Arl2 (and BART) in mitochondrial function(s), a number of genetic studies point to roles for Arl2 in MT dynamics. Direct biochemical evidence for a role of Arl2 in the complex process of the regulation of one of these cofactors, TBCD, was provided by Bhamidipati et al. [53]. In mammals, the direct binding of Arl2 to TBCD has been shown to inhibit specifically tubulin heterodimer dissociation by TBCD and the tubulin GAP activity of the TBCC/-D/E complex. More recently a 300-kDa complex that is coenriched for TBCD, heterotrimeric protein phosphatase 2A (PP2A), and the entire cytosolic pool of Arl2 has been described [54]. Heterotrimeric PP2A consists of a 63–65-kDa scaffolding A subunit, a regulatory B-type subunit, and a 36-kDa catalytic C subunit, all of which are highly conserved in eukaryotes. Several studies have reported a role for PP2A in the G2/M transition, in particular, in negatively regulating CDK1 protein kinase, which forms a complex with cyclin B [55]. Others studies have shown a role of PP2A in apoptosis induction and signaling [55, 56]. PP2A activates pro-apoptotic and inhibits anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family. Several lines of evidence indicate that alterations of PP2A activity are involved in carcinogenesis. Inhibition of PP2A activity by inhibitors such as okadaic acid, calyculin A, microcistins and nodularins induces

many types of cancer [57]. The importance of PP2A activity in cellular activities is also highlighted by the fact that papovavirus tumor antigens (small and middle T antigens) can serve as B-type subunits to alter apoptotic signaling and contribute to viral pathogenesis and oncogenesis [58, 59]. Tubulin and the MT associated protein tau have each been shown to be targets of PP2A [60]. Shern et al. described the purification of a cytosolic complex containing essentially all of the soluble Arl2 in bovine brain [54]. The presence of Arl2 in a multisubunit complex is highly unusual for a regulatory GTPase and leads to predicted novel modes of regulation. The ability of Arl2 to bind GTP, but not GDP, is completely inhibited as a result of its interaction with TBCD and PP2A. This observation leads to the prediction that Arl2 in cells is predominantly in the GDP-bound state. The activity of cofactor D associated with this complex is clearly inhibited.

Some tubulin folding proteins are extremely well-conserved

In order to determine the conservation of tubulin folding proteins among species, we have performed protein sequence alignements with the software Clustalw (Infobiogen). The results are shown in Table 1. Unlike the different TBCs which display less than 20 % of homology, the sequences of catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) and Arl2 are highly conserved between mammals and yeast. Sequences of PP2Ac display at least 70 % of homology between mammals (Human and mouse) and yeast (*S.Pombe* and *S.cerevisiae*). Sequences of Arl2 display 50% of homology between mammals and *S.Pombe.* Consequently, consensus sequences can be proposed for these 2 proteins. As protein sequences of PP2Ac and Arl2 are very similar between unicellular organisms and highly evolved multicellular organisms, we can suggest that PP2A and Arl2 support very important and conserved functions in cell biology.

Regulation of Tubulin folding: new therapeutics strategies

Taken together, these results obtained in mammalian cells suggest that Arl2 may provide a regulatory link between the control of tubulin assembly and MT dynamics, apoptotic signaling and regulation of cell division. The results from different genetic systems all suggest a role for Arl2 orthologs in MT assembly and function. The Arl2 ortholog in the yeast *S. cerevisiae*, Cin4p, is encoded by one of three non-essential genes isolated from screens aimed at identifying mutations with altered responsiveness to MT-directed stress (cold or benomyl) [37]. A very similar story emerged from studies of *S. pombe*, in which the Arl2 ortholog, alp41, was identified as an essential gene required for MT dynamics and the establishment of growth polarity [61]. We have summarized the potential regulatory roles of TBCD/Arl2/PP2A in figure 3. When Arl2 is complexed with TBCD only, the tubulin dissociating activity of TBCD is inhibited, and this could give rise to enhanced heterodimer concentration and MT dynamics. The inclusion of TBCD in a pentameric complex formed by PP2A, Arl2 and TBCD induces a complete inhibition of TBCD activity. This could lead to a decrease of heterodimer concentration and reduced MT dynamics. Alterations of MT dynamics could lead to G2/M arrest or to aberrant mitosis, although it is not clear whether enhanced or reduced MT dynamics is preferentially associated with either of these effects.

Conclusion

While the involvement of MT associated proteins in the regulation of MT dynamics has been well studied, there are some interesting data suggesting that tubulin folding mechanisms could significantly influence MT dynamics. We found that some proteins

regulating tubulin folding are highly conserved among species. Currently used tubulin binding agents target soluble dimers and/or microtubules. Tubulin folding pathways could provide an original and potent target for novel anticancer therapies.

Acknowledgements

Special thanks to Dr. Lars Jordheim and to Dr. Didier Job for their useful discussions.

References

1 Visscher, D.W., T.L. Wallis, and J.D. Crissman. Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics. *Cancer*, **1996**, 77, 315-20.

2 Segers, P., S. Haesen, P. Castelain, J.J. Amy, P. De Sutter, P. Van Dam, and M. Kirsch-Volders. Study of numerical aberrations of chromosome 1 by fluorescent in situ hybridization and DNA content by densitometric analysis on (pre)-malignant cervical lesions. *Histochem J*, **1995**, 27, 24-34.

3 Feinberg, A.P., S. Rainier, and M.R. DeBaun. Genomic imprinting, DNA methylation, and cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **1995**, 21-6.

 4. Duesberg, P., D. Rasnick, R. Li, L. Winters, C. Rausch, and R. Hehlmann. How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res*, **1999**, 19, 4887
 906.

4 Lasko, D., W. Cavenee, and M. Nordenskjold. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet*, **1991**, 25, 281-314.

5 Pihan, G.A. and S.J. Doxsey. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol*, **1999**, 9, 289-302.

6 Storchova, Z. and D. Pellman. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2004**, 5, 45-54.

7 Jordan. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem - Anti-Cancer Agents*, **2002**, 2, 1-17.

8 Cleveland, D.W., M.A. Lopata, P. Sherline, and M.W. Kirschner. Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell*, **1981**, 25, 537-46.

9 Yen, T.J., P.S. Machlin, and D.W. Cleveland. Autoregulated instability of beta-tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of beta-tubulin. *Nature*, **1988**, 334, 580-5.

10 Schwarz, P.M., J.R. Liggins, and R.F. Luduena. Beta-tubulin isotypes purified from bovine brain have different relative stabilities. *Biochemistry*, **1998**, 37, 4687-92.

11 Wang, Y., G. Tian, N.J. Cowan, and F. Cabral. Mutations affecting beta-tubulin folding and degradation. *J Biol Chem*, **2006**, 281, 13628-35.

12 Vainberg, I.E., S.A. Lewis, H. Rommelaere, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H.L. Klein, and N.J. Cowan. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell*, **1998**, 93, 863-73.

 14. Rommelaere, H., M. Van Troys, Y. Gao, R. Melki, N.J. Cowan, J. Vandekerckhove, and
 C. Ampe. Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, 90, 11975-9.

13 Lewis, S.A., G. Tian, I.E. Vainberg, and N.J. Cowan. Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol*, **1996**, 132, 1-4.

14 Tian, G., I.E. Vainberg, W.D. Tap, S.A. Lewis, and N.J. Cowan. Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. *J Biol Chem*, **1995**, 270, 23910-3.

15 Tian, G., I.E. Vainberg, W.D. Tap, S.A. Lewis, and N.J. Cowan. Specificity in chaperonin-mediated protein folding. *Nature*, **1995**, 375, 250-3.
16 Lopez-Fanarraga, M., J. Avila, A. Guasch, M. Coll, and J.C. Zabala. Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J Struct Biol*, **2001**, 135, 219-29.
17 Fontalba, A., R. Paciucci, J. Avila, and J.C. Zabala. Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis. *J Cell Sci*, **1993**, 106 (Pt 2), 627-32.
18 Simons, C.T., A. Staes, H. Rommelaere, C. Ampe, S.A. Lewis, and N.J. Cowan. Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding. *J Biol Chem*, **2004**, 279, 4196-203.
19 Sternlicht, H., G.W. Farr, M.L. Sternlicht, J.K. Driscoll, K. Willison, and M.B. Yaffe. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, 90, 9422-6.
20 Chen, X., D.S. Sullivan, and T.C. Huffaker. Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, 91, 9111-5.
21 Gao, Y., I.E. Vainberg, R.L. Chow, and N.J. Cowan. Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of alpha- and beta-tubulin. *Mol Cell Biol*, **1993**, 13, 2478-85.
22 Fanarraga, M.L., M. Parraga, K. Aloria, J. del Mazo, J. Avila, and J.C. Zabala. Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, **1999**, 43, 243-54.
23 Archer, J.E., M. Magendantz, L.R. Vega, and F. Solomon. Formation and function of the Rbl2p-beta-tubulin complex. *Mol Cell Biol*, **1998**, 18, 1757-62.
24 Archer, J.E., L.R. Vega, and F. Solomon. Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo. *Cell*, **1995**, 82, 425-34.
 27. Radcliffe, P.A. and T. Toda. Characterisation of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B. *Mol Gen Genet*, **2000**, 263, 752
 60.
25 Velculescu, V.E., L. Zhang, W. Zhou, J. Vogelstein, M.A. Basrai, D.E. Bassett, Jr., P. Hieter, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, **1997**, 88, 243-51.
26 Tian, G., S.A. Lewis, B. Feierbach, T. Stearns, H. Rommelaere, C. Ampe, and N.J. Cowan. Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol*, **1997**, 138, 821-32.
27 Feierbach, B., E. Nogales, K.H. Downing, and T. Stearns. Alf1p, a CLIP-170 domaincontaining protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin. *J Cell Biol*, **1999**, 144, 113-24.
28 Tian, G., A. Bhamidipati, N.J. Cowan, and S.A. Lewis. Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. *J Biol Chem*, **1999**, 274, 24054-8.
29 Fleming, J.A., L.R. Vega, and F. Solomon. Function of tubulin binding proteins in vivo. *Genetics*, **2000**, 156, 69-80.
30 Bartolini, F., A. Bhamidipati, S. Thomas, U. Schwahn, S.A. Lewis, and N.J. Cowan. Functional overlap between retinitis pigmentosa 2 protein and the tubulin-specific chaperone cofactor C. *J Biol Chem*, **2002**, 277, 14629-34.
31 Martin, L., M.L. Fanarraga, K. Aloria, and J.C. Zabala. Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein. *FEBS Lett*, **2000**, 470, 93-5.
32 Hoyt, M.A., T. Stearns, and D. Botstein. Chromosome instability mutants of

Saccharomyces cerevisiae that are defective in microtubule-mediated processes. *Mol Cell Biol*, **1990**, 10, 223-34.
33 Radcliffe, P., D. Hirata, D. Childs, L. Vardy, and T. Toda. Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2tubulin genes as fission yeast polarity mutants. *Mol Biol Cell*, **1998**, 9, 1757-71.
34 Hoyt, M.A., J.P. Macke, B.T. Roberts, and J.R. Geiser. Saccharomyces cerevisiae PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability. *Genetics*, **1997**, 146, 849-57.
35 Grishchuk, E.L. and J.R. McIntosh. Sto1p, a fission yeast protein similar to tubulin folding cofactor E, plays an essential role in mitotic microtubule assembly. *J Cell Sci*, **1999**, 112 (Pt 12), 1979-88.
36 Vega, L.R., J. Fleming, and F. Solomon. An alpha-tubulin mutant destabilizes the heterodimer: phenotypic consequences and interactions with tubulin-binding proteins. *Mol Biol Cell*, **1998**, 9, 2349-60.
37 Keller, C.E. and B.P. Lauring. Possible regulation of microtubules through destabilization of tubulin. *Trends Cell Biol*, **2005**, 15, 571-3.
38 Schuller, E., T. Gulesserian, R. Seidl, N. Cairns, and G. Lube. Brain t-complex polypeptide 1 (TCP- 1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease. *Life Sci*, **2001**, 69, 263-70.
39 Yoo, B.C., M. Fountoulakis, M. Dierssen, and G. Lubec. Expression patterns of chaperone proteins in cerebral cortex of the fetus with Down syndrome: dysregulation of T-complex protein 1. *J Neural Transm Suppl*, **2001**, 321-34.
40 Lee, M.J., D.A. Stephenson, M.J. Groves, M.G. Sweeney, M.B. Davis, S.F. An, H. Houlden, M.A. Salih, V. Timmerman, P. de Jonghe, M. Auer-Grumbach, E. Di Maria, F. Scaravilli, N.W. Wood, and M.M. Reilly. Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene. *Hum Mol Genet*, **2003**, 12, 1917-25.
41 Bouhouche, A., A. Benomar, N. Bouslam, T. Chkili, and M. Yahyaoui. Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia. *J Med Genet*, **2006**, 43, 441-3.
42 Barral, J.M., S.A. Broadley, G. Schaffar, and F.U. Hartl. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol*, **2004**, 15, 17-29.
43 Parvari, R., E. Hershkovitz, N. Grossman, R. Gorodischer, B. Loeys, A. Zecic, G. Mortier, S. Gregory, R. Sharony, M. Kambouris, N. Sakati, B.F. Meyer, A.I. Al Aqeel,

Table 1 : Percentage of homology between human, murine and Saccharomyces protein sequences of Protein Phosphatase 2A catalytic subunit (PP2Ac), ADP ribosylation factor like protein 2 (Arl2), and the different Tubulin Binding Cofactors (TBC).

% homology Human _Mouse		Human_ S.Pombe	Human_S. Cerevisiae	Consensus sequence
PP2Ac (309 aa)	**100**	**78**	**74,1**	.....:.....:....:::: ::::+D+W:E+L::C::L:E::V::LC:+A:+:L::E:NV+: ++:PVT+CGD+HGQFHDL+ELF:IGG::PD+NY LFMGDYVDRGY+SVETV:+LVA:K+RYP:RITI LRGNHESRQITQVYGFYDECLRKYG:ANVW K:FT+LFDY:P+TAL++::IFCLHGGLSP+I+++D +:R:L+R:QEVPHEGPMCDLLWSDPDDR+G WGISPRGAG+TFGQDISE+FNH+N+L:L::RA HQLVMEG++W:H+:+VVTIFSAPNYCYRCGN QAAI+E:D++::::FLQ+DP++R:GEP:++R+TPD YFL
Arl2 (184 aa)	**96,7**	**52,7**	**29,3**	MGLL+I+:+:K:+++E:R:L:LGLDN+GK+TI+++::: +D...:+:++PT:GF:I:+L+::+::::+WD:GGQ+:LR:: W:NYF++T:::IW++D+:+::R:::+::+L+:L++++:+::. ..:::+::+NK:D+:+++S.....:::+.::L::::::+:++:+::+S+ +TG+:::::+++L::+:::.:::::..
TBCA (108 aa)	92,6	24,1	22,6	ND
TBCB (244 aa)	88,9	26,5	21,7	ND
TBCC (346 aa)	75,4	X	11,2	ND
TBCD (1190 aa)	81,8	16,98	11,4	ND
TBCE (527 aa)	73,7	17,8	17	ND

Protein sequences alignements are made with the software Clustalw (Infobiogen) : http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl . The majority amino acid is at least present in 20% (.), or in 40% (:), or in 60% (+). ND means no consensus sequence available and X for no alignement between sequences.

Figure legend

Figure 1 : Modulation of microtubule dynamics by cellular components. α- and β-tubulin peptides undergo folding in order to obtain polymerizable αβ tubulin heterodimers . MT dynamics are crucial for cellular processes such as morphology, intracellular transport or mitosis. Tubulin isotype composition, posttranslational modifcations and MT-stabilizing and -destabilizing proteins are known to influence MT dynamic.

Figure 2 : Model of the folding pathway in mammals.

The role of prefoldin is to allow the formation of a complex between tubulin peptides and cytosolic chaperonin containing–TCP1 (CCT). Upon ATP-ADP exchange, the chaperonin CCT undergoes an allosteric conformational change. After this step, TBCA (A) and TBCB (B) might act as reservoirs for excess β- and α-tubulin, respectively. TBCD (D) and E (E) can bind to tubulin peptides released by the TBCA and B complex or directly from the tubulin-CCT complexes. Once TBCD-β˜tubulin and TBCE-α tubulin complexes are formed, polymerization-competent tubulin heterodimers are released in presence of TBCC (C) and after GTP hydrolysis. TBCC, TBCD, and TBCE can also dissociate tubulin dimers, thus altering soluble tubulin dimer pools and causing the microtubules to enter into catastrophe (mechanisms called tubulin GTP Activating Protein (GAP) activity and heterodimer

dissociation). Heterodimer dissociation is regulated by ADP ribosylation like protein 2 (Arl2). Arl2 interacts with TBCD, which, binds to GTP-bound β-tubulin. This leads to the production of polymerization-competent GTP-αβ dimers. **Figure 3 : Potential regulatory roles of different tubulin binding cofactor D (TBCD) complexes.** Alterations of tubulin folding could result in differences in soluble dimer pools and consequently in modifications of MT dynamics. The ability of TBCD to dissociate tubulin heterodimers is inhibited when it is complexed with ADP ribosylation like protein 2 (Arl2). Enhanced expression of Arl2 leads to increased heterodimer concentration and differences in MT dynamics (Beghin, et al. submitted for publication). The inclusion of TBCD in a pentameric complex formed by protein phosphatase 2A (PP2A), Arl2 and TBCD induces a complete inhibition of TBCD's activities (tubulin folding and heterodimer dissociation). Altered MT dynamics could result in G2/M arrest and/or to aberrant mitosis with aneuploidy.

Figure 1 :

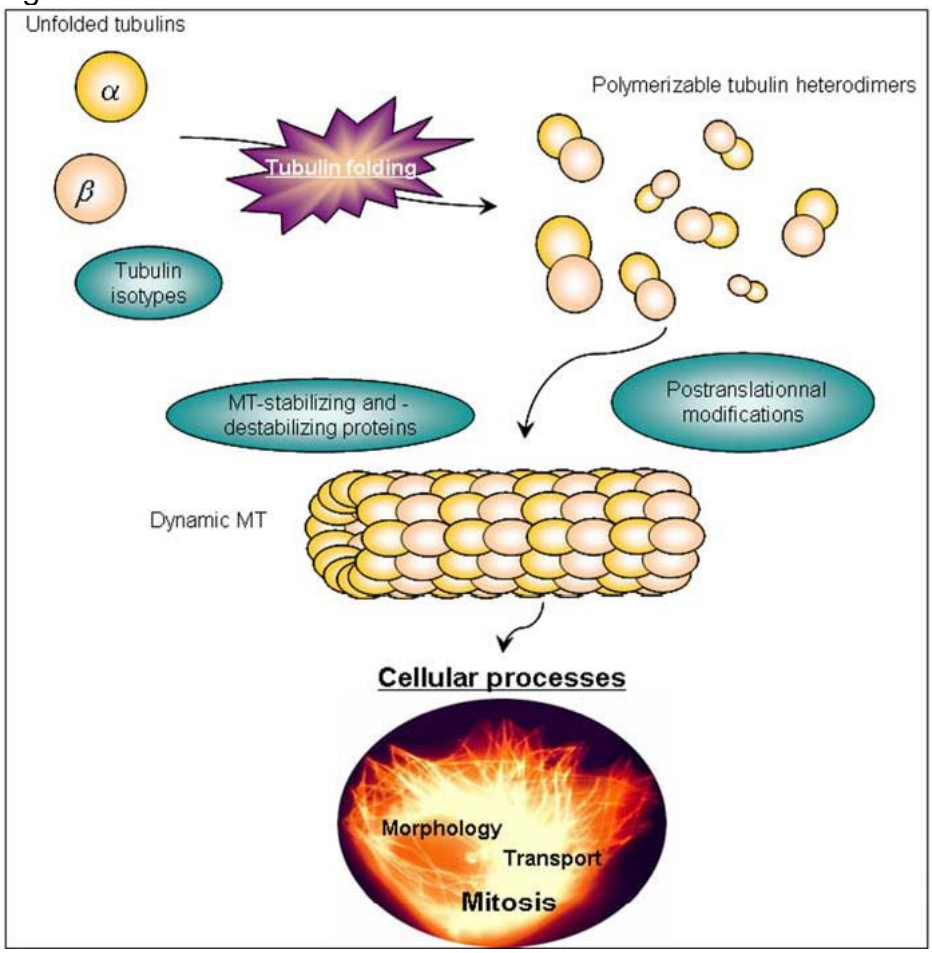


Figure 2 :

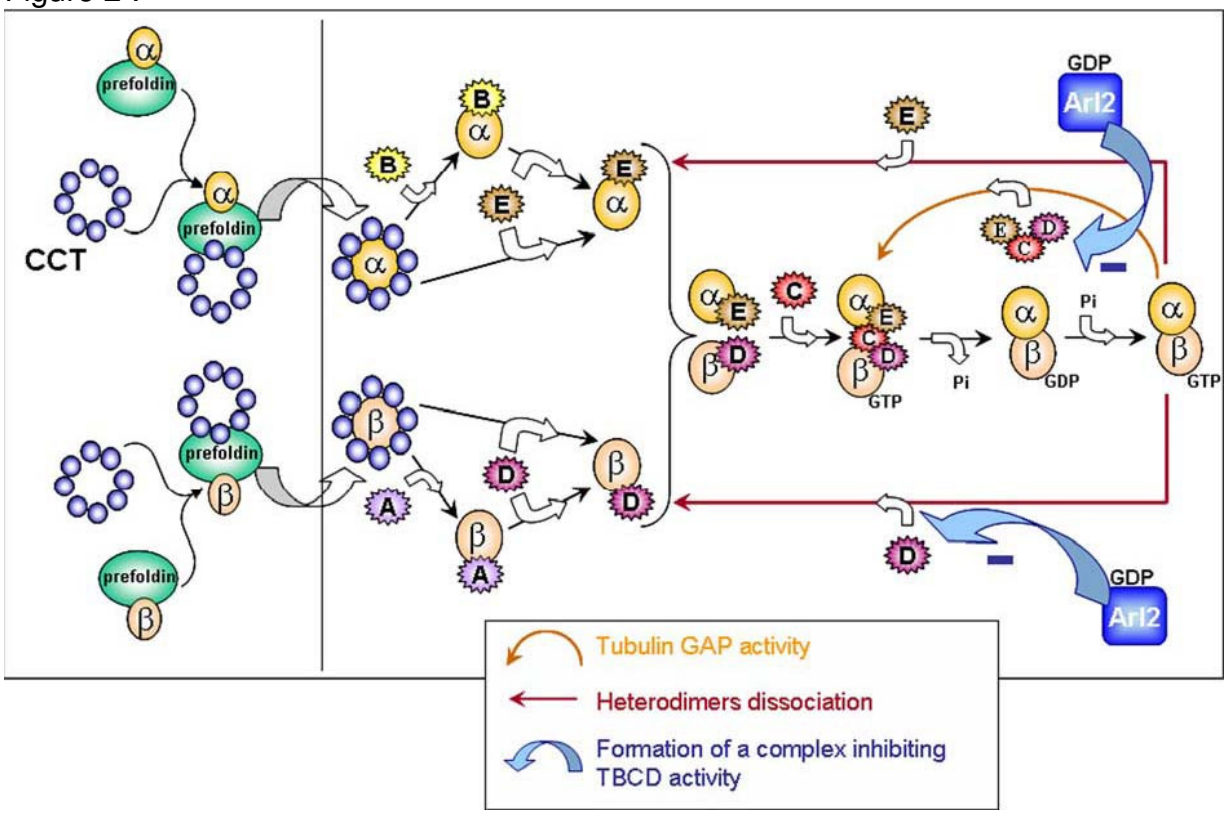
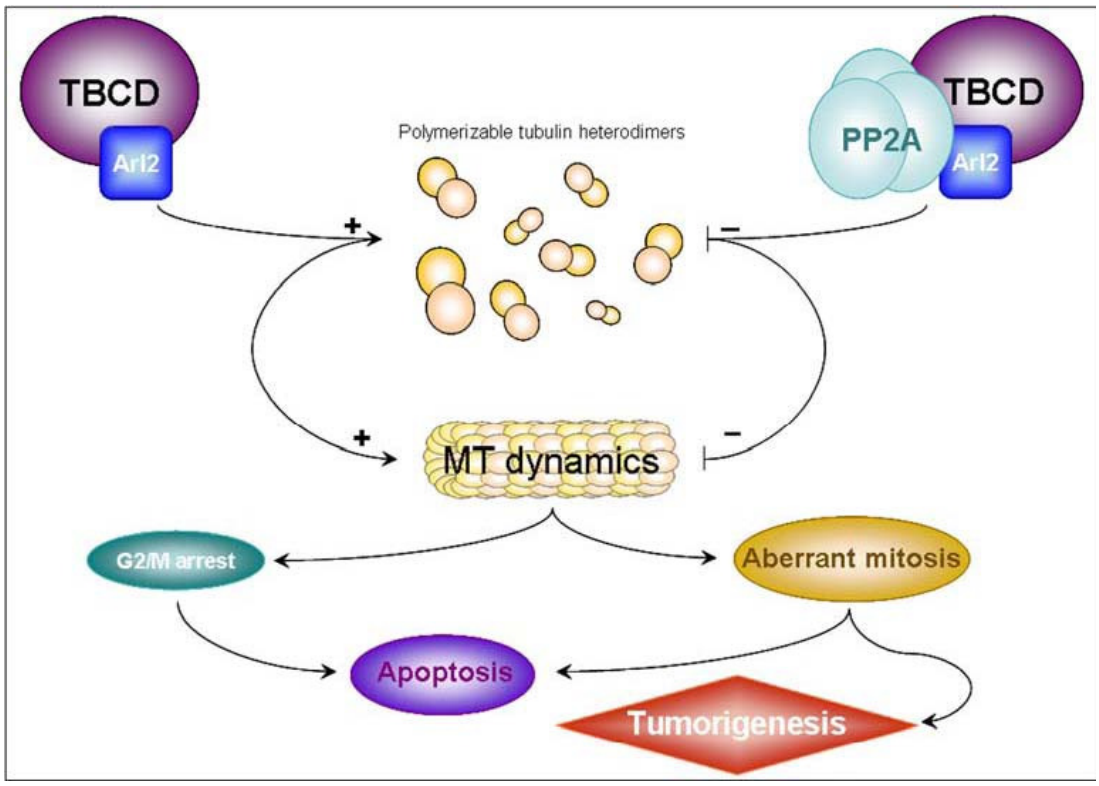


Figure 3 :



12.5. Annexe 5 : Abstracts et Posters

12.5.1. Congrès de l'American Association for Cancer Research (AACR), Los Angeles, avril 2007

Control/Tracking Number: 07-AB-1719-AACR **Activity:** Abstract Submission
Current Date/Time: 11/20/2006 1:38:46 PM
Arl2 content influences p53 phosphorylation and localization in a breast cancer cell line.
Short Title:
Arl2, p53 and microtubules
Author Block: ***Anne Béghin***, *Eva Matera*, *Marie Sylvie Negrier*, *Charles Dumontet*. Inserm 590,Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Centre Léon Bérard, Lyon, France
Abstract:
ADP-ribosylation factor like protein 2 (Arl2) has been shown to interact with tubulin binding cofactor D (TBCD), a key protein involved in the production of polymerization-competent αβ tubulin heterodimers, the basic building block of microtubules. Direct binding between Arl2 and the tumor suppressor protein phosphatase 2A (PP2A) has been also demonstrated. Variant of the human adenocarcinoma cell line MCF7 using stable transfection of pcDNA3 vectors containing the antisens construct of Arl2 (MA- cells) or the empty vector (MP cells) were produced and characterized. We have previously shown that alterations in Arl2

protein content were found to be associated with modifications in catalytic subunit of PP2A (PP2Ac) protein content in cancer cells. Given a possible role for Arl2 in the regulation of PP2A activity, we hypothesized that modifications of Arl2 expression could induce modifications of the phosphorylation status of the PP2A substrate and tumor suppressor p53. We therefore investigated the phosphorylation status and localization of p53 in various cell compartments under basal conditions and after incubation with drugs commonly used in breast cancer treatment. Using microtubule separation procedures and immunohistochemistry, we showed that the decrease of Arl2 in MA- cells induced an increase (+100%, $p<0.05$) of at least one phosphorylated form of p53 (involving the serine 15) as compared to MP cells, and is correlated with a resistance phenotype to different anti tumoral agents involving a p53 dependent apoptosis induction pathway. In these cells, phospho-ser15-p53 was found to be preferentially bound to microtubules, with no increase in nuclear localization. In order to support the implication of PP2A in p53 phosphorylation status, we used okadaic acid at concentrations which selectively inhibit PP2A and observed a significant increase (X3, $p<0.05$) in the amount of phospho-ser15-p53 in our models. Furthermore, preincubation of cells with low concentrations of okadaic acid was found to induce a strong resistance of cancer cells to anti microtubule agents (IC50 of vinorelbine treatment X50, $p<0.05$). Our results suggest that Arl2 content could influence p53 phosphorylation status by a PP2A-mediated mechanism, leading to microtubule sequestration of p53. These alterations could be involved in differential sensitivity of cells to microtubule binding agents.
Author Disclosure Block: A. Béghin, None; **E. Matera**, None; **M. Negrier**, None; **C. Dumontet**, None.

12.5.2. Congrès du Cancéropôle Rhône-Alpes Auvergne (CLARA), Grenoble, mars 2007

Arl2 influence la dynamique microtubulaire et les mécanismes de tumorogénèse dans des modèles de cancer du sein

Auteurs : **A.Béghin,** S.Brunet-Manquat, D.Braguer, C.Dumontet

ADP-rybosilation factor like protein 2 (Arl2) est une protéine régulant la formation des hétérodimères d'αβ-tubulines polymerisables en microtubules. Dans le but d'étudier l'impact d'Arl2 sur les propriétés microtubulaires, des variants de la lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire MCF7 comportant des niveaux d'expression d'Arl2 différents ont été produits et caractérisés. Nous avons montré une augmentation significative (+ 50%, $p<0.05$) du contenu en hétérodimères de tubulines solubles polymérisables pour les cellules ayant une forte expression protéique d'Arl2 (MA+) et une diminution significative (-35%, $p<0.05$) pour les cellules ayant un plus faible contenu en protéine Arl2 (MA-) de cette fraction par rapport aux cellules témoins (MP). La dynamique microtubulaire est une propriété caractérisant les variations de longueur que subissent les microtubules au cours du temps. Elle est indispensable notamment au déroulement de la mitose et est la cible d'agents thérapeutiques anticancéreux. En utilisant des techniques de microinjection de tubulines couplées à un fluorochrome et d'observation microscopique en temps

réel, la dynamique microtubulaire apparaissait significativement augmentée (+40%, $p<0.05$) dans les cellules MA+ et diminuée (-38%, $p<0.05$) dans les cellules MA- par rapport aux cellules MP. Ces modifications impliquent plusieurs paramètres de la dynamique (vitesses de polymérisations et de dépolymérisation, durée des phases d'atténuation, pourcentage de temps passé dans chaque phase (polymérisation, dépolymérisation et atténuation), fréquence de catastrophe). Nous avons également observé des modifications de la durée des différentes phases de mitoses dans nos cellules sans modifications significatives de la durée total de la mitose. De plus, nous avons observé des modifications du niveau d'expression de la protéine phosphatase 2A connue pour ses rôles de suppresseur de tumeurs et interagissant avec Arl2. Nous avons également démontré un impact important du niveau d'expression d'Arl2 sur des phénomènes tels que l'inhibition de contact, la croissance sans ancrage, le développement tumoral et le pouvoir d'infiltration *in vivo* des cellules de cancer du sein en utilisant des approches novatrices et plusieurs lignées cellulaires différentes. Il apparaissait alors qu'un fort niveau d'expression d'Arl2 était corrélé avec un développement tumoral et avec un pouvoir d'infiltration correspondant à un grade tumoral plus avancé. En conséquence le niveau d'expression d'Arl2 influence un certain nombre de paramètres microtubulaires, modifie le contenu d'une protéine suppresseur de tumeur et influence la tumorogénèse *in vivo* des cellules de cancer du sein. Arl2 pourrait par la suite être identifiée comme facteur pronostique dans le cas de patientes atteintes de cancer du sein.

12.5.3. Congrès Société Française de Cancérologie (SFC), Paris, juin 2006

ADP ribosylation factor like protein 2 (Arl2) influence la dynamique microtubulaire et le déroulement de la mitose dans des cellules de cancer du sein.

Anne Béghin[1], Céline Messana[1], Christelle Lamblot[1], EvaLaure Matera[1], Stéphane Honoré[2], Diane Braguer[2], Carlos Galmarini[1], Charles Dumontet[1].
[1] UMR INSERM 590;Université de Lyon FR69008, Lyon (France)., [2] FRE CNRS 2737, Marseille, France

ADP-rybosilation factor like protein 2 (Arl2) est une GTPase interagissant avec un cofacteur nommé tubulin binding cofactor D (TBCD) indispensable à l'obtention des hétérodimères d'$\alpha\beta$-tubulines polymerisables en microtubules. Dans le but d'étudier l'impact d'Arl2 sur les propriétés microtubulaires, nous avons développé trois variants de la lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire MCF7 en transfectant de façon stable le vecteur pcDNA3 contenant soit la séquence complète d'Arl2 en sens (cellules MA+) soit la séquence complète d'Arl2 en antisens (cellules MA-) et soit en tranfectant le vecteur vide (cellules témoin MP). Les cellules MA+ présentaient effectivement une augmentation (+30%) et les cellules MA- une diminution (-35%) du niveau protéique d'Arl2 par rapport aux cellules MP. Nous avons également observé au niveau protéique des modifications du niveau d'expression du cofacteur TBCD et de la protéine phosphatase 2A (PP2A), protéine interagissant avec Arl2 et impliquée dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires (pour exemple les voies AKT et mTOR). Par séparation par ultracentrifugation en présence de GTP des fractions de

tubulines solubles polymérisables et non polymérisables, nous avons montré une augmentation significative (+ 50%, $p<0.05$)) du contenu en hétérodimères de tubulines solubles polymérisables pour les cellules MA+ et une diminution significative (-35%, $p<0.05$) pour les cellules MA- de cette fraction par rapport aux cellules MP. A l'inverse, le contenu en tubuline non polymérisable était plus important (+20%, $p<0.05$) dans les cellules MA- par rapport aux cellules MP et diminué (-20%, $p<0.05$) dans les cellules MA+. La dynamique microtubulaire est une propriété caractérisant les variations de longueur que subissent les microtubules au cours du temps. Elle est indispensable notamment au déroulement de la mitose et est la cible d'agents thérapeutiques anticancéreux. Cette dynamique a été étudiée par microinjection de tubuline-Rhodamine et les extrémités d'au moins 50 microtubules de cellules interphasiques ont été suivi par microscopie à fluorescence pour chaque lignées cellulaires. La dynamique microtubulaire apparaissait significativement augmentée (+40%, $p<0.05$) dans les cellules MA+ et diminuée (-38%, $p<0.05$) dans les cellules MA- par rapport aux cellules MP. Plus particulièrement, ces modifications impliquées des paramètres tels que les vitesses de polymérisations et de dépolymérisation, la durée des phases d'atténuation (phases correspondants à aucune variation de longueur du microtubule), le pourcentage de temps passé dans chaque phase (polymérisation, dépolymérisation et atténuation) et la fréquence de catastrophe (fréquence de transition entre phase de polymérisation ou d'atténuation et phase de dépolymérisation) des microtubules. Par analyse microscopique en temps réelle en contraste de phase, nous avons également observé des modifications de la durée des différentes phases de mitoses dans nos cellules sans modifications significatives de la durée total de la mitose. Les cellules MA+ présentaient une transition métaphase-anaphase plus rapide (x2, $p<0.05$)), transition nécessitant la participation de microtubules à dynamique élevée. Des modifications similaires ont été observées à l'inverse pour les cellules MA- qui montraient donc une transition métaphase-anaphase plus longue (-40%, $p<0.05$) que les cellules MP. En conséquence le niveau d'expression d'Arl2 influence le contenu en tubulines polymérisables et le niveau d'expression de PP2A et a pour conséquence fonctionnelle de perturber la dynamique microtubulaire et la progression mitotique. La dynamique microtubulaire étant la cible d'agents thérapeutiques dans le cadre notamment des traitements de cancer du sein, Arl2 pourrait par la suite être identifiée comme facteur influençant la réponse à ces traitements.

12.5.4. Congrès de l'American Association for Cancer Research (AACR), Washington D.C, avril 2006

Control/Tracking Number: 06-AB-1105-AACR **Activity:** Abstract Submission
Current Date/Time: 11/8/2005 11:36:22 AM
ADP ribosylation factor like protein 2 (Arl2) regulates microtubule composition and dynamics in breast cancer cells.
Short Title:
Arl2 and microtubule dynamics **Author Block *Anne Beghin*,** *Celine Messana*, *Christelle Lamblot*, *EvaLaure Matera*, *Stephane Honore*, *Diane Braguer*, *Carlos Galmarini*, *Charles Dumontet*. INSERM 590, Lyon, France, FRE CNRS 2737, Marseille, France

ADP-rybosilation factor like protein 2 (Arl2) has been show to interact with tubulin binding cofactor D (TBCD), a key protein involved in the production of polymerization-competent αβ tubulin heterodimers, the basic building block of microtubules. In order to study Arl2 impacts in microtubules properties, we have developed three variants of the human breast adenocarcinoma MCF7 line using stable transfection of pcDNA3 vectors containing the entire coding sequence of Arl2 (MA+ cells), or an antisens construct of Arl2 (MA- cells) or the empty vector (MP cells). MA+ cells had an Arl2 protein level 35 % higher than MP cells and MA- had a decrease of 40% of Arl2 protein level compared to MP cells. Western blot analysis processed after separation of the different fractions of tubulins (solubles heterodimers, microtubules and unfolded tubulins) showed that the content in polymerizable tubulin heterodimers was significantly increased in MA+ cells and reduced in MA- cells in comparison to the MP cells. Conversely, the fraction of unfolded tubulin which could not be induced to polymerize was larger in MA- cells and decreased in MA+ cells compared to MP cells. Time lapse analysis of microtubules dynamics was performed by microinjection of rhodamine tubulin in live cells. Microtubules dynamicity was significantly enhanced in MA+ cells and reduced in MA- cells compared to MP cells. Particularly, these alterations involved modifications of the microtubule plus end rates of growth and shortening, duration of attenuation phases, percentage of time spent in each phase (growth, shortening and attenuation) and catastrophe frequency. We also observed some modifications in expression level of protein phosphatase 2Ac, which has been shown to form a complex with Arl2 and to trigger some proteins involved in microtubules dynamic regulation. Breast cancer cells with Arl2 modified expression level have also important modifications in class III β tubulin content, which is involved in resistance mechanisms to tubulin binding agents (TBA). Finally, the cell cycle distribution was modified in these cells in response to TBA treatment such as vinorelbine and paclitaxel, which can be explained by microtubule dynamicity modifications. Consequently, Arl2 protein levels have an impact on microtubule dynamicity by the regulation of polymerization-competent αβ tubulin heterodimer levels. These observations are the first evidence of important roles of Arl2 in microtubule

dynamicity and in sensitivity to TBA.
Author Disclosure Block: A. Beghin, None; C. Messana, None; C. Lamblot, None; E. Matera, None; S. Honore, None; D. Braguer, None; C. Galmarini, None; C. Dumontet, None.

RESUME en français

La forme native des hétérodimères de tubulines, indispensable à leur incorporation aux microtubules, est obtenue après prise en charge des tubulines par différentes protéines chaperonnes. Arl2 (ADP Ribosylation Factor-like Protein 2) est une protéine qui régule l'action de certaines protéines chaperonnes des tubulines. En utilisant des modèles de cancer du sein, nous avons montré dans ce travail que des modifications de l'expression d'Arl2 induisaient (1) des perturbations importantes de la dynamique microtubulaire et de la mitose ; (2) une chimiorésistance à différents agents anticancéreux par un mécanisme dépendant de la phosphatase PP2A et associé au facteur de transcription p53 ; (3) des modifications de la croissance tumorale. Les résultats obtenus ont permis d'établir, pour la première fois, un lien entre des événements régulant la production de tubulines fonctionnelles et des perturbations au niveau des phénotypes microtubulaires et cellulaires de cellules cancéreuses humaines. Ce travail ouvre des perspectives nouvelles dans l'identification de facteurs influençant à la fois la chimiorésistance et le développement tumoral de cellules cancéreuses mammaires.

TITRE en anglais : Roles of Arl2 in tumoral phenotype and chemoresistance mechanisms in breast cancer.

RESUME en anglais

The native form of tubulins heterodimers, essential for their polymerization into microtubules, is obtained after several chaperone proteins action. Arl2 (ADP Ribosylation Factor-like Protein 2) is involved in the regulation of some of these tubulin chaperone proteins. In breast cancer cells models, we have showed that Arl2 expression level perturbations induce (1) important modifications of microtubules dynamic and of mitosis ; (2) chemoresistance to different antitumoral agents by a PP2A-dependant mechanism and associated with p53 transcription factor and (3) alterations of tumoral development. These results have permitted to establish, for the first time, a correlation between regulations of functional tubulin production and microtubular and cellular phenotype of human cancer cells. This work opens new perspectives of identification of new factors implicated in chemoresistance and tumoral development in breast cancer cells.

DISCIPLINE : Cancérologie

MOTS-CLES : Arl2, microtubules, phénotype tumoral, chimiorésistance, cancer du sein.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de cytologie analytique, INSERM U590, Faculté de Médecine Rockefeller, 8 avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France