



**HAL**  
open science

# La protéine ATIP3 et ses partenaires d'interaction : de nouvelles cibles thérapeutiques contre le cancer du sein

Anne Nehlig

► **To cite this version:**

Anne Nehlig. La protéine ATIP3 et ses partenaires d'interaction : de nouvelles cibles thérapeutiques contre le cancer du sein. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS461 . tel-03020640

**HAL Id: tel-03020640**

**<https://theses.hal.science/tel-03020640>**

Submitted on 24 Nov 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# ATIP3 et ses partenaires d'interaction : de nouvelles cibles thérapeutiques contre le cancer du sein

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°582 CBMS Cancérologie : biologie - médecine -  
santé  
Spécialité de doctorat: aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 23 Novembre 2018, par

**Anne NEHLIG**

Composition du Jury :

Dr Julie WELBURN  
Principal Investigator, University of Edinburgh

Présidente-  
Examinatrice

Dr Ali BADACHE  
Directeur de recherche, INSERM (UMR1068)  
Dr Claude PRIGENT  
Directeur de recherche, CNRS (UMR 6290)

Rapporteur

Pr Christian POÛS  
Professeur, Paris Saclay  
Dr Clara NAHMIAS  
Directrice de recherche, INSERM (UMR981)

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse



# Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier tous les membres de mon jury, mes rapporteurs, Claude Prigent et Ali Badache et mes examinateurs, Julie Welburn, Christian Poüs et Mehdi Khaled, pour avoir accepté de juger mon travail.

Un MERCI tout particulier à ma directrice de thèse, Clara Nahmias, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et soutenue. Merci pour le temps consacré aux réflexions, aux corrections et m'avoir permis de participer à différents congrès.

MERCI à Odyssea, Prolific et La Ligue contre le Cancer pour avoir financé mes années de doctorat, et à la SBCF pour m'avoir offert une bourse de voyage pour participer au congrès international de l'ASCB à Philadelphie en décembre 2017.

Ces quatre années de thèse n'ont pas été toujours faciles, beaucoup le savent, il y eu des hauts et des bas et je n'aurai peut-être pas tenu le coup sans les personnes que je remercie ici.

MERCI à mes parents pour m'avoir donné les moyens de réussir, pour m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris et avoir toujours été aux petits soins dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour votre amour et votre aide au quotidien.

MERCI à ma grande sœur, Aurélia pour avoir toujours été là pour moi, malgré les 8000 km qui séparent Paris du Canada pendant les deux dernières années.

MERCI à mes amies et collègues, Sylvie, Cynthia et Hadia de la « MT team », Aurélie, Audrey et Chloé de la team gynéco. L'ambiance était toujours au top, cela m'a permis de garder le moral tous les jours. Je garderai en mémoire tous ces bons moments passés ensemble à parler de tout et de rien (vraiment de tout et de rien !) et de nos supers apéros ! Merci Sylvie pour m'avoir tout appris, pour m'avoir formée, pour avoir toujours été à l'écoute, pour tous tes conseils, pour ta bonne humeur et pour tes excellents gâteaux :p. Merci Cynthia, « la princesse » et la meilleure des coéquipières, pour ton aide précieuse, pour toutes les manips que tu as faites pour moi, je sais que les IP t'ont rendues folles ! Je n'oublierai pas ces « le lundi au soleil... » et « raaabbiit » et la liste est encore

longue ! Merci à toi et Hadia, ma voisine de bureau, pour votre soutien, pour les moments de délire, de détente et les moments passés à l'extérieur du labo.

MERCI à mes amies et anciennes collègues qui ont déjà quittées l'IGR, Laure, Elise, Yasmina, Clarisse et Estelle. Je suis heureuse que nos chemins se soient croisés pendant mes années de thèse et que vous fassiez dorénavant parties de ma vie. Aux personnes concernées : on s'en souviendra de ces histoires de chaudières et de dragon !

MERCI à tous mes amis et collègues de l'unité U981 que j'ai croisés pendant cinq années dans les couloirs du B2M et qui te donnent le sourire, avec qui on trouve toujours un moment pour discuter, pour aller prendre un petit dej', un goûter ou un apéro.

MERCI à mes meilleures amies Kathell et Gwen, mes amis de longues dates et mes ami(e)s de Bordeaux qui me comprennent et qui sont toujours là pour moi dans n'importe quelle situation.

MERCI à mes anciens coloc', Alizé, Pauline et Thomas, pour m'avoir supportée les deux premières années de thèse, et qui ont fait de cette thèse une plus belle aventure qu'elle ne l'aurait été si j'avais été seule. J'ai passé d'excellents moments avec vous que je n'oublierai jamais ! Merci d'avoir été là !

MERCI à Zumba France et ses cours endiablés dans les Clubs de Paris pour m'avoir fait décompresser et de m'avoir fait reprendre goût à ma passion, la danse.

Enfin, un grand MERCI à mon amour, Guillaume. Merci de m'avoir supportée ces deux dernières années, merci pour le courage et l'amour que tu m'as apporté au quotidien. Merci de m'avoir fait rire tous les jours, et de m'avoir soutenue quand la motivation était au plus bas. Merci pour avoir pris soin de moi. Tu l'auras vécu avec moi cette thèse, ça c'est sûr !

Cette thèse a été une sacrée épreuve, riche en travail et en émotions, pleine de remise en question sur moi-même et sur le métier de la recherche et je n'y serai jamais arrivée sans vous tous ! Merci à vous tous pour votre soutien, votre amitié et votre amour ! Et... finalement sans cette thèse... je n'aurai pas fait de si belles rencontres !

PS : Pardonnez-moi pour mon insociabilité ces dernières années, j'espère pouvoir me rattraper dès à présent ! 😊

# Table des matières

Remerciements .....	2
Liste des figures .....	8
Liste des abréviations.....	10
I. Introduction .....	15
1. Cancer du sein .....	15
1.1 Généralités sur le cancer du sein.....	15
1.2 Anatomie du cancer du sein.....	17
1.3 Epidémiologie du cancer du sein.....	20
1.4 Classification du cancer du sein.....	22
1.4.1 Classification histologique du cancer du sein.....	22
1.4.2 Classification moléculaire du cancer du sein.....	24
1.5 Thérapies contre le cancer du sein.....	27
1.5.1 Chimiothérapies conventionnelles/MTAs.....	27
1.5.2 Thérapies ciblées utilisées en clinique.....	29
1.5.2.1 L'hormonothérapie .....	29
1.5.2.2 Thérapie ciblée HER2.....	30
1.5.2.3 Autres thérapies ciblées .....	31
1.5.3 Essais cliniques dans le cancer du sein .....	32
2. La mitose .....	35
2.1 Aneuploïdie, CIN et cancer .....	35
2.2 Les différentes étapes de la mitose .....	37
2.3 La métaphase : une étape cruciale .....	40
2.3.1 Le centrosome.....	41
2.3.2 Le centromère et le kinétochore .....	42
2.3.3 Contrôle de la métaphase par le SAC.....	44
2.4 Le fuseau mitotique .....	47
2.4.1 Description.....	47
2.4.2 Assemblage du fuseau mitotique.....	48
2.4.3 Défauts du fuseau mitotique.....	48
2.4.4 Régulation de la taille du fuseau mitotique .....	52
2.4.5 Flux de MTs dirigés vers les pôles (« poleward flux »).....	53
2.5 Régulation de la mitose par la kinase mitotique, Aurora Kinase A.....	57
2.5.1 La famille des Aurora Kinases .....	58

2.5.2 Rôle d'AurKA en mitose .....	60
2.5.3 Régulation d'AurKA .....	61
2.5.4 AurKA et cancer .....	62
3. Les microtubules.....	64
3.1 Structure des microtubules .....	64
3.2 Dynamique des microtubules .....	67
4. Protéines associées aux microtubules (MAPs).....	69
4.1 Protéines régulatrices du fuseau mitotique .....	69
4.1.1 Les MAPs classiques .....	69
4.1.2 Les MAPs motrices.....	71
4.1.3 +TIPs.....	74
4.2 EB1 (End-binding protein 1) .....	75
4.2.1 La famille des End-Binding Protein (EBs) .....	75
4.2.2 EB1, régulateur de la dynamique des microtubules .....	76
4.2.3 Partenaires d'EB1 .....	78
4.2.4 EB1 et MTAs.....	79
4.2.5 Modifications post-traductionnelles d'EB1 .....	80
4.2.6 Les fonctions d'EB1 en mitose .....	81
4.2.7 EB1 et cancer.....	82
5. Axe Kif2A-Dda3 dans la régulation du fuseau mitotique.....	83
5.1 Kif2A .....	83
5.1.1 La famille des kinésines-13.....	83
5.1.2 Les fonctions de Kif2A.....	84
5.1.3 Régulation de Kif2A.....	86
5.1.4 Kif2A et cancer .....	86
5.2 Dda3.....	87
5.2.1 Découverte et structure de Dda3.....	87
5.2.2 Les effets de Dda3 en mitose .....	88
5.2.3 Le complexe Kif2A-Dda3.....	90
6. ATIP3, une protéine anti-cancer associée aux microtubules .....	91
6.1 MTUS1, gène candidat suppresseur de tumeur .....	91
6.2 La famille des protéines ATIP .....	94
6.3 <i>MTUS1</i> est altéré dans les cancers.....	97
6.4 Effets anti-tumoraux d'ATIP3 .....	99
6.5 ATIP3, une protéine qui stabilise les microtubules .....	101

II. Objectifs et questions posées.....	107
III. Résultats.....	109
1. ARTICLE 1: .....	109
2. ARTICLE 2: .....	115
3. ARTICLE 3: .....	117
4. ARTICLE 4 :.....	120
IV. Conclusions .....	123
V. Discussion et perspectives .....	127
VI. Références.....	142
VII. Annexes.....	173





## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Progression d'une tumeur primaire en métastases à distance.....	15
<b>Figure 2</b> : Caractéristiques principales de la cellule cancéreuse.....	17
<b>Figure 3</b> : Anatomie du sein.....	18
<b>Figure 4</b> : Représentation du réseau lymphatique du sein.....	19
<b>Figure 5</b> : Schéma d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire.....	20
<b>Figure 6</b> : Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein.....	21
<b>Figure 7</b> : Schéma représentatif de carcinome.....	23
<b>Figure 8</b> : Clusters des différents sous-types moléculaires du cancer du sein.....	25
<b>Figure 9</b> : Cascade de signalisation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs).....	30
<b>Figure 10</b> : Défauts de ségrégation des chromosomes et CIN.....	36
<b>Figure 11</b> : Différence entre CIN et aneuploïdie.....	37
<b>Figure 12</b> : Le cycle cellulaire.....	38
<b>Figure 13</b> : Les étapes de la mitose.....	39
<b>Figure 14</b> : Les éléments essentiels qui constituent l'étape de métaphase.....	41
<b>Figure 15</b> : Schéma représentant le complexe KMN de l'« outer » kinétochore.....	44
<b>Figure 16</b> : Mécanisme du SAC.....	45
<b>Figure 17</b> : Flux des microtubules kinétochoriens.....	47
<b>Figure 18</b> : La structure dynamique du fuseau mitotique.....	48
<b>Figure 19</b> : Représentations et descriptions des défauts du fuseau mitotique.....	49
<b>Figure 20</b> : Visualisation du flux de MTs dirigé vers les pôles.....	54
<b>Figure 21</b> : Acteurs principaux du MT « poleward flux ».....	57
<b>Figure 22</b> : Kinases mitotiques majeures dans les phases de la mitose.....	58
<b>Figure 23</b> : Schéma des structures des protéines kinases AurKA, AurKB et AurKC.....	59
<b>Figure 24</b> : Localisation de Aurora-A kinase lors de la mitose.....	60
<b>Figure 25</b> : Structure du microtubule.....	65
<b>Figure 26</b> : Structure en rubans des dimères de tubuline.....	66
<b>Figure 27</b> : Instabilité dynamique des microtubules.....	68
<b>Figure 28</b> : Implication de la katanine, spastine et fidgetine dans le flux de MTs.....	71
<b>Figure 29</b> : Analyse phylogénique des KIFs.....	73
<b>Figure 30</b> : Classification des +TIPs en fonction de leur structure.....	74
<b>Figure 31</b> : Schéma représentatif de la séquence protéique d'EB1.....	75
<b>Figure 32</b> : Région d'interaction de la protéine EB1 au bout plus du microtubule.....	77
<b>Figure 33</b> : Localisation d'EB1 en interphase et en mitose.....	82
<b>Figure 34</b> : Structure schématique de Kif2A.....	84
<b>Figure 35</b> : Localisation de Kif2A dans les différentes phases de la mitose.....	84
<b>Figure 36</b> : Courbes de survie en fonction des niveaux d'expression du gène DDA3.....	90
<b>Figure 37</b> : Organisation structurale de <i>MTUS1</i> et des produits du gène <i>MTUS1</i> .....	93
<b>Figure 38</b> : La famille des protéines ATIP.....	95
<b>Figure 39</b> : Sous-expression d'ATIP3 dans les carcinomes de sein invasifs.....	99
<b>Figure 40</b> : Effets anti-tumoraux et anti-métastatiques d'ATIP3.....	100
<b>Figure 41</b> : Association d'ATIP3 aux microtubules en interphase et en mitose.....	102
<b>Figure 42</b> : Schéma représentatif des domaines d'ATIP3.....	103

**Figure 43** : Schéma de synthèse de la régulation négative par ATIP3.....126

## Liste des abréviations

+TIP	Plus-end Tracking Protein
ACF	Actin Crosslinking Factor
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
AI	Aromatase Inhibitor
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC/C	Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome
AR	Androgen Receptor
ASB7	Cullin 5-interacting suppressor of cytokine signaling box 7
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
AT2	AngioTensin 2
ATIP	AT2 receptor-Interacting Protein
ATP	Adenosine TriPhosphate
AurK	Aurora Kinase
BRCA	BReast CAncer
BrdU	BromodeoxyUridine
Bub	Budding Uninhibited by Benomyl
CAP-Gly	Cytoskeleton-Associated Proteins Gly-rich protein
CDKs	Cyclin-Dependent Kinases
CENP	CENtromere-associated Protein
Cep	CENtrosomal Protein
CH	Calponin Homology
CIN	Chromosomal INstability
CLASP	CLIP-associating protein
CLIP	Cytoplasmic Linker Protein
CPAP	Centrosomal P4.1-Associated Protein
CPC	Chromosomal Passenger Complex
DCIS	Ductal Carcinoma <i>In Situ</i>
DDA3	Differential Display and activated by p53
EB	End Binding
EBH	End Binding Homology

EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
Fbxw7	F-box/WD repeat-containing protein 7
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GDP	Guanosine-5'-Diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3)
GST	Gluthatione S-Transferase
GTP	Guanosine-5'-Triphosphate
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
HSET	Human Spleen Embryonic Tissue
ICIS	« inner » Centromere kin-I Stimulator
INCA	Institut National du CAncer
JAK	Janus Kinase
KT	Kinétochore
LCIS	Lobular Carcinoma <i>In situ</i>
LIMK2	LIM Domain Kinase 2
MACF	MT-actin crosslinking factor
MAD	Mitotic Arrest Deficient
MAP	Microtubule-Associated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPRE	Microtubule Associated Protein RP/EB
MCAK	Mitotic Centromere-Associated Kinesin
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
Mdp3	Microtubule-associated protein 7 domain-containing 3
MT	Microtubule
MTA	Microtubule-Targeting Agent
MTOC	Microtubule Organizing Center
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MTUS1	Microtubule-associated TUmor Suppressor 1
NuMA	NUclear Mitotic Apparatus
OS	Overall Survival

PARP	Poly ADP-ribose Polymérase
PCM	PeriCentriolar Material
PFS	Progression Free Survival
PI3K	PhosphoInositide-3-Kinase
PLKs	Polo-Like Kinases
PP1/2	Protein Phosphatase 1/2
PR	Progesterone Receptor
RFS	Relapse-Free Survival
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCF	SKP1-Cullin1-Fbox
Ska1	Spindle and KT associated protein 1
SKP1	S-phase kinase-associated protein 1
SxIP	Ser-X-Ile-Pro
TACC	Transforming Acidic Coiled-coil
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer
TPX2	Targeting Protein for Xklp2
TTBK	Tau-TuBulin Kinase
$\gamma$ TuRC	$\gamma$ -Tubulin-Ring-Complex



# I. Introduction



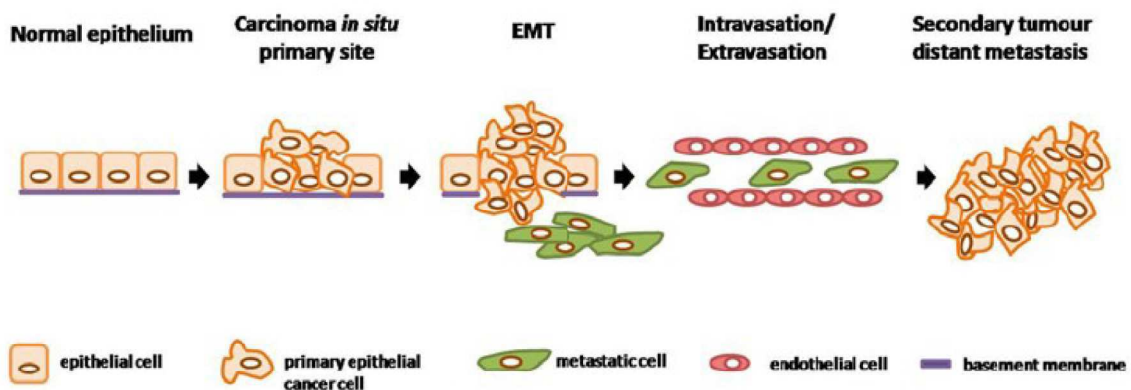
# I. Introduction

## 1. Cancer du sein

### 1.1 Généralités sur le cancer du sein

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde avec 8,8 millions de décès en 2015, soit presque un décès sur six dû au cancer (WHO, World Health Organization, 2015<sup>1</sup>). En France métropolitaine, le nombre estimé de nouveaux cas de cancers diagnostiqués en 2017 est de 399 500 (214 000 hommes et 185 500 femmes) et celui de décès par cancer est de 150 000 (84 000 hommes et 66 000 femmes) (INCA, Institut National du Cancer, 2018<sup>2</sup>).

Le cancer est un processus complexe qui se développe en trois étapes : l'initiation de la tumeur, la progression du cancer et la formation de métastase. La maladie débute par une lésion précancéreuse qui contient des cellules en cours de transformation, puis une cellule cancéreuse apparaît et commence à proliférer. Dans un premier temps, la tumeur de petite taille reste localisée dans le tissu d'origine (tumeur « *in situ* »), puis elle grossit et les cellules se détachent de la tumeur primaire (tumeur « *invasive* ») et gagnent la lymphe et la circulation sanguine pour former des métastases à distance (**Figure 1**).



**Figure 1** : Progression d'une tumeur primaire en métastases à distance.

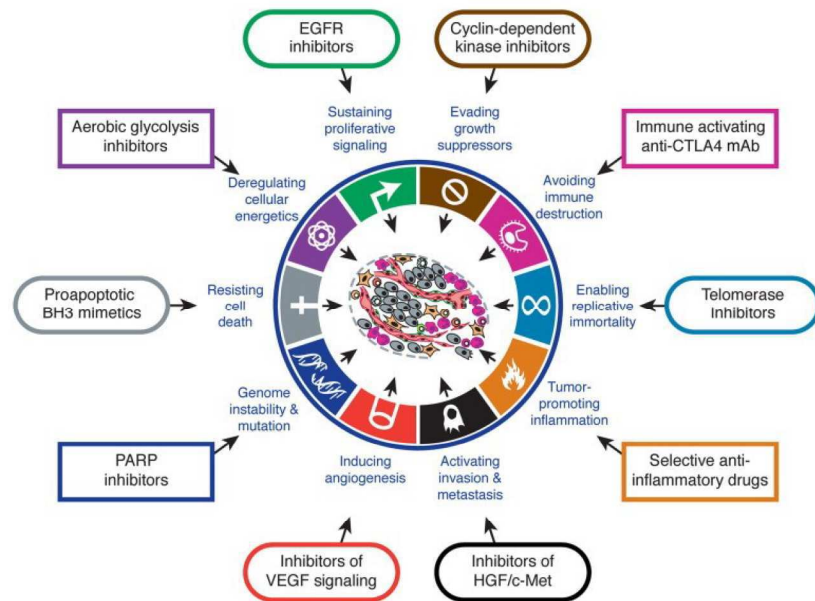
(D'après Chiblak and Abdollahi, 2012)

<sup>1</sup>WHO, World Health Organization, 2015, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

<sup>2</sup>INCA, Institut National du Cancer, 2018, <http://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/L-Institut-national-du-cancer-publie-l-essentiel-des-faits-et-chiffres-des-cancers-en-France-en-2017>

On peut parler de cancers malins et bénins. Les cancers malins peuvent se propager et envahir les tissus voisins et peuvent également se déplacer à travers la circulation sanguine ou le système lymphatique pour former de nouvelles tumeurs au niveau d'autres organes éloignés de la tumeur d'origine, c'est ce qu'on appelle les métastases à distance. Les métastases sont à l'origine de 90% des décès des personnes atteintes d'un cancer et représentent une complication fatale de la maladie. Les cancers bénins, eux, ne se propagent pas et n'envahissent pas les tissus voisins, et contrairement aux tumeurs malignes, ceux-ci, une fois enlevés, ne réapparaissent plus en général.

Selon Hanahan D et Weinberg RA (2011), le développement du cancer peut être causé par des dérégulations de certains processus physiologiques. Dix propriétés biologiques principales acquises lors du développement des cancers humains ont été décrites. (**Figure 2**) (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces processus incluent l'échappement au système immunitaire, la promotion de l'inflammation et de l'angiogenèse, la dérégulation du métabolisme, l'immortalité due à une réplication de l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique) illimitée, la maintenance d'un état prolifératif constant, la résistance à la mort cellulaire, l'échappement aux suppresseurs de croissance, l'instabilité génomique et l'acquisition de mutations, et la capacité d'invasion et de formation de métastases. Aujourd'hui, ces processus peuvent être ciblés par des thérapies connues, déjà approuvées ou actuellement en essai clinique.

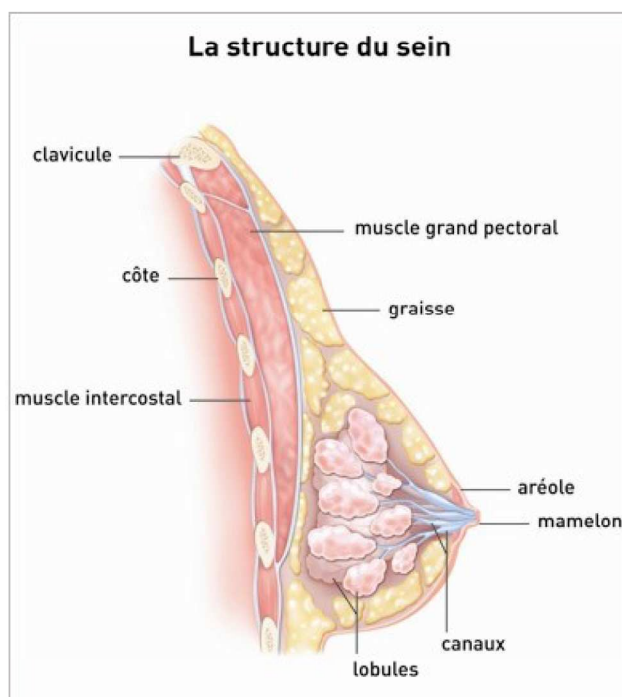


**Figure 2** : Caractéristiques principales de la cellule cancéreuse.

(D'après Hanahan et Weinberg, 2011)

## 1.2 Anatomie du cancer du sein

Chaque sein contient une glande mammaire et du tissu de soutien qui est composé de vaisseaux, de fibres et de graisse. La glande mammaire est composée de quinze à vingt compartiments, séparés par du tissu graisseux, qui sont eux-mêmes constitués de lobules et de canaux lactifères. Les lobules produisent le lait lors de l'allaitement et les canaux transportent le lait vers le mamelon (**Figure 3**).



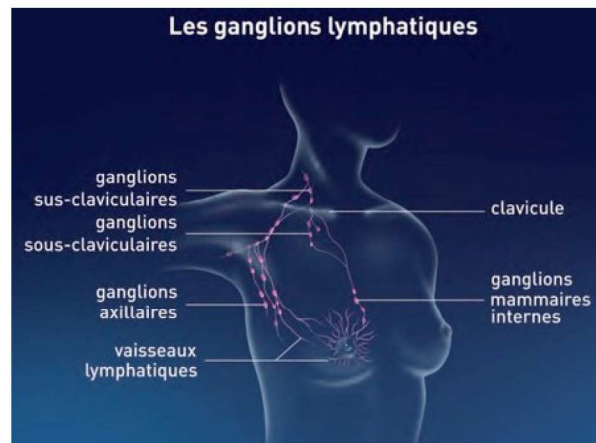
**Figure 3** : Anatomie du sein.

(D'après l'INCA<sup>3</sup>)

La glande mammaire se développe et fonctionne sous l'influence des hormones sexuelles fabriquées par les ovaires : les œstrogènes et la progestérone. Les œstrogènes permettent le développement du sein au moment de la puberté et sont importants tout au long de la grossesse. La progestérone joue un rôle dans la différenciation des cellules du sein et dans le cycle menstruel, en préparant par exemple l'utérus à une éventuelle grossesse.

Pour son bon fonctionnement, la glande mammaire est parcourue par des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les ganglions lymphatiques sont principalement situés au niveau de l'aisselle (ganglion axillaires), au-dessus de la clavicule (ganglions sus-claviculaires), sous la clavicule (ganglions sous-claviculaires ou infra-claviculaires) et à l'intérieur du thorax, autour du sternum (ganglions mammaires internes) (**Figure 4**).

<sup>3</sup> <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Anatomie-du-sein>



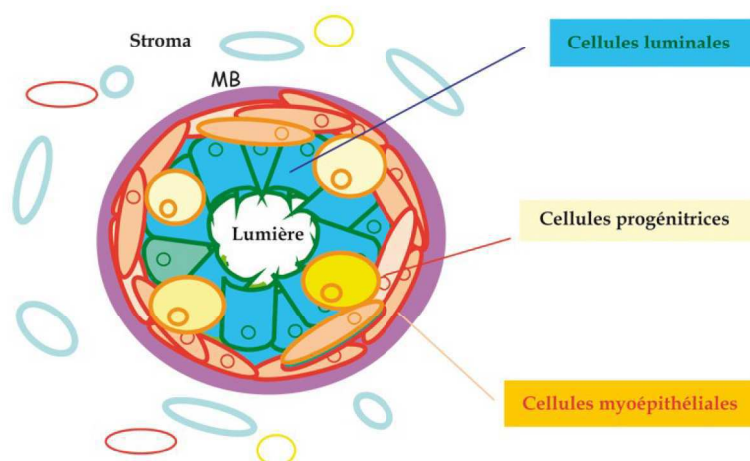
**Figure 4 :** Représentation du réseau lymphatique du sein.

(D'après l'INCA<sup>4</sup>)

A l'échelle cellulaire, la glande mammaire est une structure complexe constituée par différents types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes (Schmeichel et al., 1998). L'épithélium mammaire est constitué de deux types de cellules différenciées : les cellules luminales et les cellules myoépithéliales. Les cellules luminales sont isolées et bordent la lumière des canaux et des lobules. D'un autre côté les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont en contact avec la lame basale et le stroma environnant. Les cellules épithéliales expriment les récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et aux androgènes (AR). Il a été rapporté que ces trois hormones stéroïdes jouent un rôle clé dans le développement et les fonctions de la glande mammaire (Li et al., 2010) (**Figure 5**).

---

<sup>4</sup> <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Anatomie-du-sein>



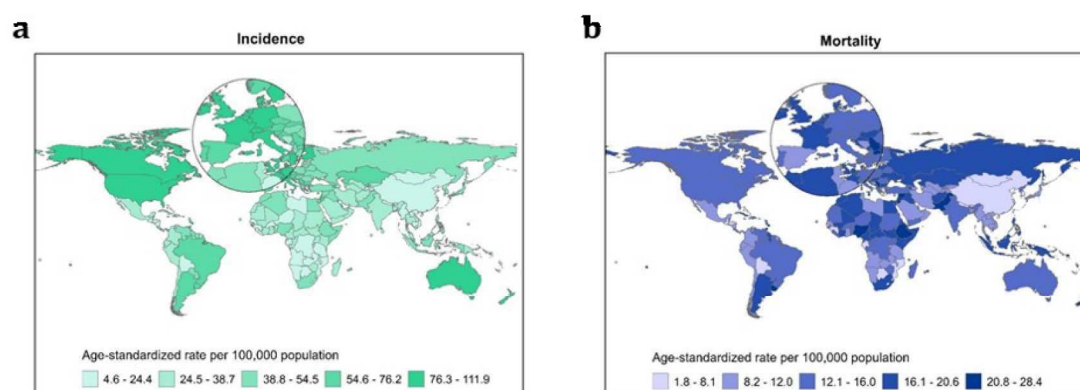
**Figure 5** : Schéma d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire. MB : membrane basale.

(D'après <http://www.ipubli.inserm.fr><sup>5</sup>)

### 1.3 Epidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est le plus fréquemment observé chez les femmes en France, comme dans l'Union Européenne et aux Etats-Unis et est la première cause de décès chez la femme dans le monde entier, avec une estimation de 1,7 millions de cas et plus de 500 000 décès en 2012, c'est-à-dire 25% des cas de cancer et 15% de décès liés au cancer (Ferlay et al., 2015). Les taux d'incidence les plus élevés se trouvent en Amérique du Nord, en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Europe du Nord et de l'Ouest (**Figure 6a**). Les taux de mortalité reflètent aussi bien la présence de la maladie que la disponibilité des moyens de détection précoce et des traitements. Les pays à moyens et faibles revenus, comme les pays de l'Afrique subsaharienne, ont des taux de mortalité par cancer du sein plus élevés que les autres pays malgré leur faible taux d'incidence, dû à leur diagnostic tardif et leur accès limité au traitement (**Figure 6b**).

<sup>5</sup>[http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre\\_26.html?sequence=1672&isAllowed=y](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre_26.html?sequence=1672&isAllowed=y)



**Figure 6 :** Taux d'incidence (a) et de mortalité (b) du cancer du sein chez les femmes du monde entier en 2012.

(D'après GLOBOCAN 2012<sup>6</sup>)

En France, 1 femme sur 8 est touchée par le cancer du sein. Il se situe au premier rang des cancers chez la femme en termes d'incidence et de décès. Il a été recensé 54 062 nouveaux cas en 2015 et 11 913 décès cette même année (INCA, 2016<sup>7</sup>).

Outre le sexe (plus de 99% des cancers du sein touchent les femmes), il existe plusieurs facteurs de risque de cancer du sein : l'âge, les antécédents personnels de maladie (cancer de l'ovaire et/ou de l'endomètre), les antécédents familiaux, les prédispositions génétiques, la consommation d'alcool, le manque d'activité physique, le surpoids, l'utilisation d'hormones exogènes (contraceptions, traitements hormonaux de la ménopause) (Bradbury and Olopade, 2007; Colditz and Bohlke, 2014). Et de récentes études ont montré une association entre le tabagisme et le cancer du sein (Carter et al., 2015; on behalf of the Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES) et al., 2016). A l'inverse, il a été rapporté que l'allaitement réduit légèrement les risques de cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002), en particulier dans les sous-types de cancer du sein à récepteurs hormonaux négatifs (Islami et al., 2015).

L'augmentation du taux d'incidence des cancers du sein dans les pays développés de 1980 jusqu'à la fin des années 90, et actuellement dans les pays sous-développés, est

<sup>6</sup> GLOBOCAN 2012, [global-burden-of-cancer-in-women.pdf](#)

<sup>7</sup> INCA, 2016, <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Quelques-chiffres>

probablement dûe aux changements dans l'utilisation de la thérapie hormonale de la ménopause, à une amélioration des connaissances et au dépistage par mammographie (Althuis et al., 2005; Colditz et al., 2006).

Dans les pays développés, les cancers du sein sont souvent diagnostiqués à une étape précoce et le pronostic est bon, alors que dans les pays sous-développés le cancer du sein est plutôt détecté à une étape tardive et le taux de survie est faible. La survie à 5 ans est de 85% ou plus aux Etats-Unis, au Canada, en Australie, en Israël, au Brésil et dans beaucoup de pays de l'Europe du Nord et de l'Ouest, tandis qu'elle est de seulement 60% voire moins dans les pays à moyens ou faibles revenus comme l'Afrique du Sud, la Mongolie, l'Algérie et l'Inde (Allemani et al., 2015).

### 1.4 Classification du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie hétérogène et diffère selon les patientes (hétérogénéité inter-tumorale) et au sein même de chaque tumeur individuelle (hétérogénéité intra-tumorale) (Ellsworth et al., 2017). L'hétérogénéité tumorale est une des caractéristiques de la malignité. Les premières études définissaient l'hétérogénéité tumorale en se basant sur l'identification de populations cellulaires intra-tumorales avec différentes caractéristiques telles que la tumorigénicité, la résistance aux traitements et le potentiel métastatique (Fidler and Kripke, 1977; Fidler, 1978; Miller et al., 1983). L'hétérogénéité du cancer du sein au niveau cellulaire a été reconnue dès le 19<sup>e</sup> siècle (Young and Louis, 2011), mais c'est seulement il y a 30 ans que la pertinence clinique a été établie avec l'évaluation des récepteurs à l'œstrogène, ER (Hawkins et al., 1988). Actuellement, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'hétérogénéité tumorale reste importante pour le diagnostic, le pronostic et le choix des thérapies contre le cancer du sein.

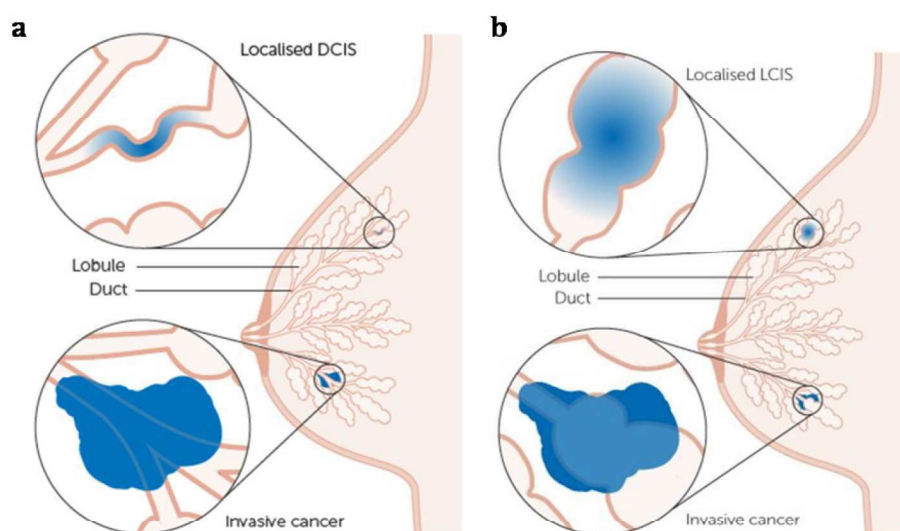
#### 1.4.1 Classification histologique du cancer du sein

D'un point de vue histologique, les tumeurs du sein peuvent être classées en deux groupes : les carcinomes *in situ* et les carcinomes infiltrants.

Les carcinomes *in situ* sont des tumeurs de cellules malignes qui se développent dans la lumière des canaux et des lobules sans franchir la membrane basale et sans envahir les tissus voisins. On peut distinguer les carcinomes canauxiers *in situ* (DCIS pour Ductal Carcinoma *In Situ*) et les carcinomes lobulaires *in situ* (LCIS pour Lobular Carcinoma *In*



*situ*) (**Figure 7**). Les carcinomes canaux *in situ* sont les carcinomes *in situ* les plus fréquents des cancers *in situ* (15 à 20% des cancers du sein), ils sont caractérisés par la présence de cellules tumorales dans les canaux galactophores et ne sont pas invasifs. Ils sont principalement traités par chirurgie. Les DCIS de haut grade peuvent néanmoins devenir invasifs s'ils ne sont pas traités. Les carcinomes lobulaires *in situ* (ou néoplasie lobulaire) sont plus rares (0,5% des cancers mammaires) et sont caractérisés par la présence de cellules anormales dans les lobules du sein. Les femmes atteintes d'un LCIS ont 8 à 10 fois plus de risque de développer un cancer du sein infiltrant (Portschy et al., 2013).



**Figure 7** : Schéma représentatif d'un carcinome canalaire *in situ* (a) et d'un carcinome lobulaire *in situ* (b). Les cancers du sein canalaire et lobulaire infiltrants sont également représentés.

(D'après Cancer Research UK, 2012<sup>8</sup>)

Les carcinomes infiltrants sont caractérisés par leur capacité à envahir le tissu conjonctif et à former des métastases. Le carcinome canalaire infiltrant représente 70 à 80% des cancers du sein. Il se forme le long des canaux galactophores et se caractérise par une prolifération incontrôlée et par l'invasion des tissus voisins.

Le carcinome lobulaire infiltrant est plus rare (5 à 15%) et se développe initialement au niveau des lobules.

<sup>8</sup> <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/types>

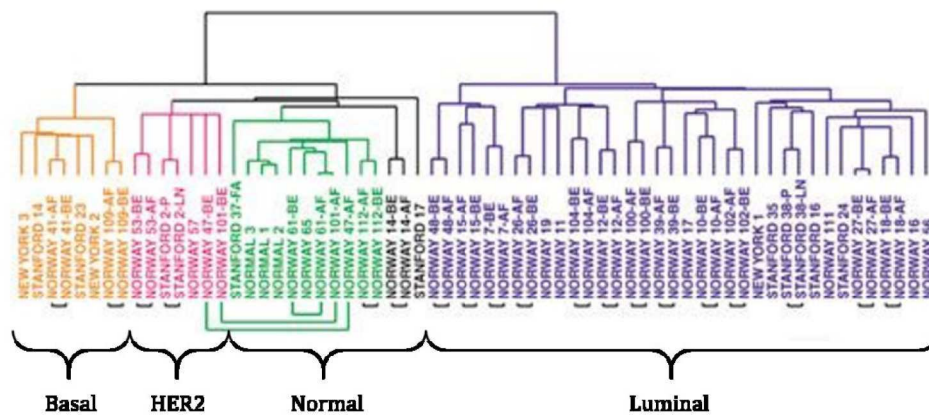
Il existe d'autres types de carcinomes infiltrants beaucoup moins fréquents comme par exemple les carcinomes tubulaires, mucineux et papillaires qui ont généralement d'excellents résultats cliniques par comparaison aux DCIS et LCIS (Rosen et al., 1993; Rakha et al., 2010) et qui ne sont pas toujours traités par chimiothérapie (Colleoni et al., 2011).

Au niveau clinique, le cancer du sein n'est pas seulement défini par sa morphologie. L'expression des récepteurs hormonaux (récepteur à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR) et du récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) est évaluée systématiquement dans tous les carcinomes invasifs du sein par immunohistochimie (IHC) en fonction des recommandations de l'ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist) (Hammond et al., 2010; Wolff et al., 2013). Ces biomarqueurs sont des facteurs pronostics (associés à la survie des patientes) et prédictifs (associés à la réponse au traitement) et leur expression est primordiale pour classer les cancers du sein et guider le traitement des patientes (Harris et al., 2016).

### 1.4.2 Classification moléculaire du cancer du sein

Depuis la fin des années 1990, l'essor des techniques de séquençage à haut débit a permis de joindre une caractérisation moléculaire aux données histologiques et cliniques classiques, ce qui a permis de classer les différents types de cancers du sein d'une nouvelle manière.

Perou et Sorlie ont proposé en 2000 une classification moléculaire des cancers du sein basée sur une étude mettant en évidence une expression différentielle de gènes (Perou et al., 2000). Cette étude a permis d'établir cinq sous-groupes majeurs de cancers du sein basés sur l'expression transcriptionnelle de plusieurs centaines de gènes : les luminal A, luminal B, HER2-positif, basal et normal (**Figure 8**). De façon intéressante, cette classification moléculaire était très proche de celle établie par les méthodes d'immunohistochimie. Cependant, dû fait de son coût, les analyses transcriptomiques des tumeurs du sein ne sont pas réalisées en routine, contrairement à l'immunohistochimie.



**Figure 8** : Analyse de clusters des différents sous-types moléculaires du cancer du sein.

(D'après Perou et al., 2000)

Le sous-type luminal A est le plus fréquent et représente 2/3 de tous les cas de cancers du sein. Il correspond à des cancers de bas grade et donc de pronostic favorable. Les tumeurs lumineuses de sous-type luminal A et B expriment les récepteurs hormonaux (ER+/PR+) et sont principalement traitées par hormonothérapie. Les lumineuses B se différencient des lumineuses A par une augmentation de l'expression de gènes associés à la prolifération et sont de plus mauvais pronostic (Sørli et al., 2003). On peut distinguer les lumineuses B qui sur-expriment HER2 (luminal B HER2-positif) et celles qui ne l'expriment pas (luminal B HER2 négatif). Parmi elles, ce sont les lumineuses B HER2-négatives qui sont les plus fréquentes (Lam et al., 2014). Les récepteurs ER et PR sont exprimés dans approximativement 80% et 60-70% des carcinomes de sein, respectivement (Harvey et al., 1999; Bardou et al., 2003). Bien que les tumeurs ER-positives co-expriment le récepteur PR (ER+/PR+) dans 70 à 80% des cas, certains carcinomes sont ER+/PR-, ou rarement ER-/PR+. La réponse au traitement hormonal varie aussi, avec une meilleure réponse (60%) dans les tumeurs ER+/PR+ et un taux de réponse plus faible pour les tumeurs ER+/PR- et ER-/PR+ (Lakhani et al., 2012; Turashvili and Brogi, 2017).

Le sous-type HER2 est caractérisé par une amplification du gène codant pour le récepteur du facteur de croissance épidermique humain HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) et de gènes liés à la prolifération. Ce sous-type représente 15 à 20% des cancers du sein et est de très mauvais pronostic mais montre un fort taux de réponse aux thérapies qui ciblent la voie HER2 (trastuzumab, lapatinib) (Dean-Colomb and Esteva,

2008). Ainsi, une réponse pathologique complète (pCR, caractérisée par une absence de progression tumorale et d'invasion ganglionnaire) après traitement néo-adjuvant a été observée dans 50 à 60% des patientes développant des tumeurs HER2-positives (Cortazar et al., 2014).

Les tumeurs de sous-type basal-like sont enrichies en gènes exprimés dans les cellules épithéliales basales n'exprimant pas de récepteurs hormonaux et il n'existe pas de thérapies ciblées pour ces cancers. Parmi les basal-like, 70% sont des cancers du sein triple-négatifs, ER-/PR-/HER2- (Sorlie et al., 2001). Ces cancers triple-négatifs n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes (ER), ni à la progestérone (PR) et ne présentent pas d'amplification de l'oncogène HER2. Ils constituent un groupe extrêmement hétérogène tant sur le plan histologique que génétique, pronostique et sur la réponse au traitement. Ces tumeurs représentent moins de 15% des cancers du sein et sont responsables de 25% des décès liés à ce cancer. Ils répondent difficilement aux traitements disponibles, c'est pourquoi de nombreux essais thérapeutiques sont mis en place pour ces cancers. Du fait de leur hétérogénéité clinique, leur importante capacité à proliférer et à migrer et l'absence de thérapies ciblées, les triple-négatifs constituent le sous-type avec le plus mauvais pronostic vital. Des données récentes ont suggéré que l'expression nucléaire du récepteur à l'androgène (AR) peut être détectée dans 12 à 55% des tumeurs triple-négatives (Barton et al., 2015). Les essais cliniques en cours évaluant les antagonistes de AR (bicalutamide et enzalutamide) dans les cancers du sein triple-négatifs AR+ montrent des résultats prometteurs (Gucalp and Traina, 2016).

Enfin, le sous-groupe « normal-like » est caractérisé par des cellules ayant des caractéristiques proches de celles des cellules de tissu mammaire sain. Cependant ce sous-type initialement décrit tend à disparaître car il s'agirait en fait de cellules malignes ayant migré dans du tissu sain.

Une centaine d'autres biomarqueurs ont été proposés pour améliorer le diagnostic, le pronostic et les solutions thérapeutiques dans le cancer du sein. Ces biomarqueurs peuvent être classés selon leurs effets fonctionnels incluant la croissance et la prolifération (Ki-67, survivine, NGAL), l'invasion et les métastases (p53, MMP-9, SK1, DcR3, COX2, EZH2, microARNs miR-105 et miR126), la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour Epithelial-Mesenchymal Transition) (WNT5A/B, Pea3), la

réponse immunitaire (PD-L1), la résistance à la thérapie (HER2 $\Delta$ 16, pSTS3, KLK10) et la survie (miR-574-3p, miR-660-5p, PIWIL3, PIWIL4) (Lee and Moon, 2016), ce qui rejoint les processus clés du développement d'un cancer décrits par Hanahan et Weinberg en 2011 (**Figure 2**).

### 1.5 Thérapies contre le cancer du sein

L'identification de biomarqueurs a permis de proposer des thérapies adaptées pour les patientes atteintes d'un cancer du sein, telles que l'hormonothérapie pour les cancers ER+ et une thérapie ciblée pour les tumeurs HER2+. En revanche, l'hétérogénéité des cancers du sein du sous-type triple-négatif rendant difficile la mise au point de thérapies ciblées, la chimiothérapie conventionnelle est souvent utilisée pour ces cancers, c'est pourquoi il est primordial d'identifier de nouveaux biomarqueurs pour améliorer les thérapies personnalisées dans ces tumeurs.

#### 1.5.1 Chimiothérapies conventionnelles/MTAs

La thérapie dite « conventionnelle » ou « cytotoxique » est utilisée avant opération pour réduire la taille de la tumeur (traitement néo-adjuvant), ou après opération pour limiter les risques de récurrences et en association avec une hormonothérapie ou une thérapie ciblée dans le cas de cancers du sein métastatiques.

Il existe deux grandes classes de chimiothérapies pour traiter les cancers du sein : les agents ciblant l'ADN et les agents ciblant les microtubules (MTs). Elles sont souvent administrées en combinaison pour une plus grande efficacité.

Les agents ciblant l'ADN incluent les anthracyclines, la gemcitabine et la capecitabine. Ces agents induisent l'apoptose des cellules cancéreuses via une inhibition de la synthèse d'ADN ou de sa transcription. Ces molécules s'intercalent au niveau des bases de l'ADN et créent ainsi une déformation de la double hélice, une stabilisation du complexe topoisomérase II-ADN et une rupture du double brin d'ADN (Hortobágyi, 1997; Morris and Hudis, 2009). Les anthracyclines sont les plus connues et les plus utilisées, parmi elles on distingue l'épirubicine et la doxorubicine. Cette dernière est communément utilisée pour divers types de cancers dû à son importante efficacité contre les tumeurs, cependant, comme toutes les anthracyclines, elle présente une toxicité cardiaque importante qui peut limiter son usage (Fumoleau and Guiu, 2013).

Les agents ciblant les microtubules (MTAs pour Microtubule Targeting Agent) incluent les vinca-alcaloïdes, l'éribuline, les épothilones et les taxanes. Ces molécules cytotoxiques inhibent la prolifération cellulaire en modulant la dynamique et la structure des microtubules. Elles se lient directement aux microtubules entraînant des défauts dans la formation du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes, ce qui cause un arrêt de la mitose et la mort cellulaire. Les MTAs peuvent être classés en deux groupes, les agents stabilisateurs de microtubules et les agents déstabilisateurs de microtubules, selon leurs effets sur la dynamique du microtubule. Parmi les agents qui déstabilisent les microtubules, on retrouve les vinca-alcaloïdes (vincristine, vinblastine, vinorelbine, vinflunine) et l'éribuline. Les vinca-alcaloïdes empêchent la polymérisation des MTs, ce qui cause un arrêt en métaphase. L'éribuline déstabilise les MTs en supprimant leur croissance et en séquestrant la tubuline en agrégats (« bundles »), ce qui gêne la formation du fuseau mitotique et induit un blocage en mitose (Cortes et al., 2012; Scarpace, 2012). Les agents qui stabilisent les microtubules incluent les taxanes (docetaxel et paclitaxel) et les épothilones. Les taxanes se fixent à la tubuline pour inhiber la dépolymérisation des MTs, améliorer l'assemblage du MT et favorisent ainsi la formation de « bundles » et de MTs stabilisés (Morris et al., 2009). Le paclitaxel et le docetaxel sont largement utilisés pour le traitement des cancers du sein métastatiques, cependant ils entraînent des effets secondaires lourds tels qu'une toxicité neuronale et hématopoïétique et de nombreux phénomènes de résistance se développent. Les traitements par épothilones sont fréquemment utilisés pour les tumeurs résistantes ou insensibles aux taxanes. Epothilones et ixabepilones sont des cytotoxiques qui se lient aux MTs sur le site de fixation des taxanes et sont impliqués dans la polymérisation, la formation de « bundles » et l'inhibition de la dépolymérisation des MTs (Morris et al., 2009; Pagano et al., 2012).

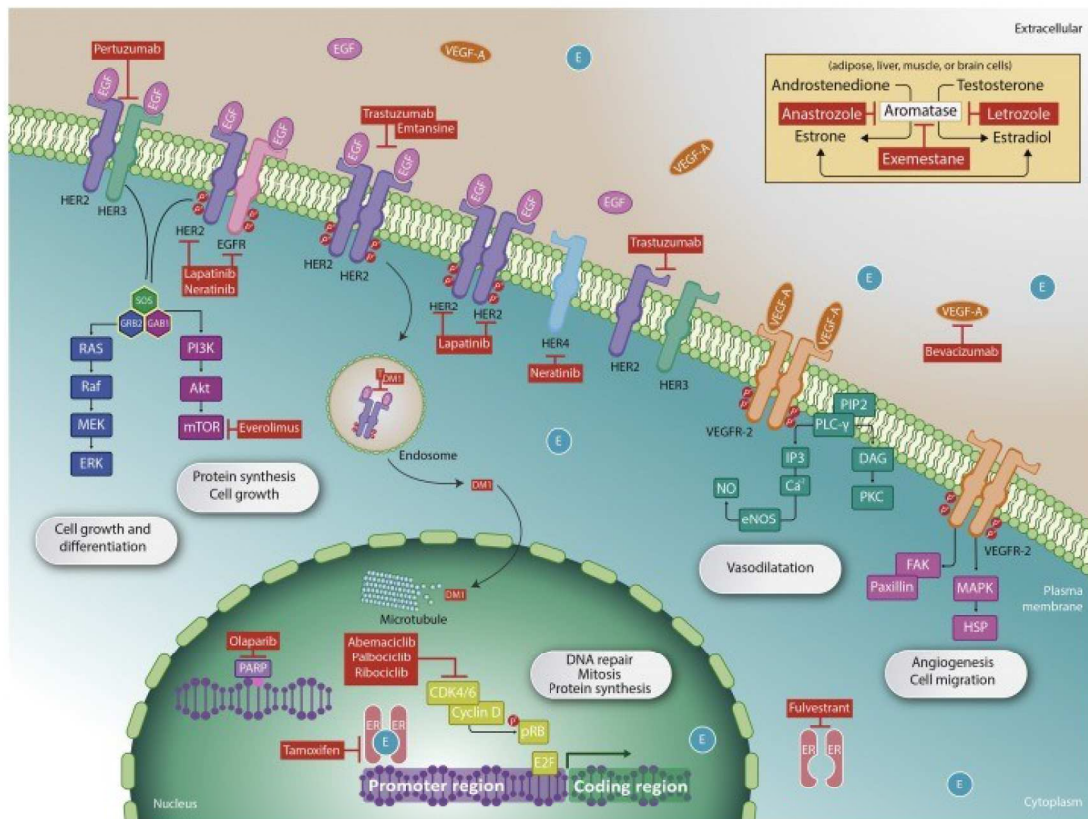
Même si ces agents sont utilisés pour ralentir la progression tumorale, le risque de développement d'une résistance aux traitements et d'une rechute de la patiente, avec de forts effets secondaires et à long terme, a créé un besoin urgent de comprendre les mécanismes d'action de MTAs modulant la dynamique des MTs pour mieux cibler le cytosquelette avec des molécules moins toxiques. Il est également primordial d'identifier de nouvelles cibles endogènes pour contrer les cancers du sein.

### 1.5.2 Thérapies ciblées utilisées en clinique

Il existe plusieurs thérapies utilisées en clinique pour les patientes atteintes d'un cancer du sein, dans lesquelles les molécules transmembranaires et intracellulaires sont ciblées pour inhiber les voies menant à la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie, l'angiogenèse et la migration cellulaire (**Figure 9**).

#### 1.5.2.1 L'hormonothérapie

Le récepteur à l'œstrogène, ER, a été la première molécule utilisée comme cible pour les thérapies contre le cancer du sein. En tant que récepteur nucléaire, ER possède un domaine d'interaction à l'ADN (DBD) qui lui permet de contrôler l'expression de gènes. Les co-facteurs qui sont associés à ER, comme FOXA1, GATA3 et PBX1, participent à l'attachement de ER à l'ADN permettant une régulation de la transcription (Carroll, 2016). Le tamoxifène a été la première thérapie ciblée approuvée dans le cancer du sein en 1977. Il est le représentant d'un groupe de modulateurs sélectifs des récepteurs à l'œstrogène (SERMs pour Selective Estrogen Receptor Modulators) non stéroïdiens, qui sont des antagonistes sélectifs du récepteur ER (Brufsky and Dickler, 2018). Il existe également les SERDs (Selective Estrogen Receptor Downregulators), qui se lient à ER et ont un double effet sur le récepteur : ils présentent une activité antagoniste et induisent une dégradation rapide des ER. Le fulvestrant est le seul médicament de ce groupe, qui agit comme sous-régulateur de l'ER, approuvé pour le traitement des cancers du sein ER+ en situation métastatique (Gemignani and Hetzel, 2017). Les inhibiteurs de l'aromatase (AIs) représentent une autre classe de thérapies ciblées pour le traitement endocrinien qui empêchent la conversion des androgènes en œstrogènes dans les tissus périphériques. Ils sont proposés aux femmes en période postménopause en situation d'adjuvant et métastatique (Kaklamani and Gradishar, 2017).



**Figure 9 :** Cascade de signalisation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs) et des molécules intracellulaires associées aux thérapies utilisées en clinique pour les cancers du sein.

(D'après Godone et al, 2018)

### 1.5.2.2 Thérapie ciblée HER2

Une thérapie ciblée est également disponible pour les cancers du sein de sous-type HER2 de stade précoce et avancé (Loibl and Gianni, 2017). Le trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé contre le domaine extracellulaire de HER2, inhibe la voie intracellulaire qui mène à la prolifération et la différenciation (Hudis, 2007; Verma et al., 2012). Une méta-analyse de huit essais randomisés et contrôlés impliquant presque 12 000 patientes développant un cancer du sein HER2+ de stade précoce a montré qu'un traitement à base de trastuzumab améliorait la survie sans maladie (DFS pour Disease-Free Survival) et la survie globale (OS pour Overall Survival) (Moja et al., 2006). Cette thérapie est le traitement standard pour ces patientes, bien que d'autres anti-HER2 soient actuellement utilisés comme un anticorps monoclonal qui inhibe la dimérisation de HER2 avec HER3 (Pertuzumab), une drogue combinée à l'anticorps trastuzumab (Ado-



trastuzumab emtansine) (Barok et al., 2014) et de petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase de HER2 (lapatinib et neratinib)(Baselga et al., 2017).

Il existe d'autres thérapies ciblées qui ont émergé ces dernières années ciblant les cancers du sein ER+/PR+ et HER2+, certaines déjà autorisées sur le marché, d'autres encore en essais cliniques (voir paragraphe **1.5.3**).

### *1.5.2.3 Autres thérapies ciblées*

Le palbociclib, le ribociclib et l'abemaciclib (Tripathy et al., 2017) sont des inhibiteurs de CDK4/6, capables de vaincre ou de retarder la résistance à la thérapie hormonale, qui ont été approuvés pour les cancers du sein ER+ et HER2+ avancés. Ces thérapies ont montré une amélioration de la survie sans progression (PFS pour Progression Free Survival) quand elles sont administrées avec une thérapie hormonale en première ligne (Goetz et al., 2017).

La voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est aussi une cible pour le traitement des cancers du sein. L'everolimus est un inhibiteur de mTOR approuvé, utilisé pour traiter les femmes en période postménopause développant un cancer du sein ER+ avancé ayant rechuté ou évolué suite à un traitement à base d'inhibiteurs de l'aromatase (AI) (Baselga et al., 2012).

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui se lie au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor) et inhibe de ce fait sa liaison avec ses récepteurs, avec comme conséquence une inhibition de l'angiogenèse, la croissance tumorale et la survie des cellules. Il a reçu une première approbation de la FDA (Food and Drug Administration) en combinaison à la chimiothérapie en première ligne de traitement pour les cancers du sein HER2 négatifs avancés (Varella et al., 2017).

Le développement des inhibiteurs de PARPs (Poly (ADP-ribose) polymérase) a été une avancée prometteuse pour les cancers du sein porteurs de mutations BRCA1/2 (Breast Cancer). Les PARPs sont une famille de nucléoprotéines fortement impliquées dans la régulation de gènes, le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 empêchent les mécanismes de réparation des cassures double brin par la voie de recombinaison homologue (HR). Etant donné que les

PARPs ciblent une voie de réparation de l'ADN différente, celle des cassures simple brin, et donc complémentaire à celle des gènes BRCA1/2, l'inhibition des PARPs aboutit, par un phénomène de létalité synthétique, à la mort cellulaire par apoptose des cellules déficientes en BRCA1/2. Les PARPs sont donc une parfaite cible thérapeutique dans les cancers du sein mutés pour BRCA1/2 (Jubin et al., 2016). L'essai clinique de phase III (OlympiAD) a démontré les bénéfices de l'olaparib, un inhibiteur oral de PARP, dans la PFS en comparaison à la chimiothérapie conventionnelle pour des patientes développant des tumeurs métastatiques HER2 négatives et porteuses d'une mutation BRCA (Robson et al., 2017). D'autres inhibiteurs de PARP sont actuellement en essais cliniques (voir le paragraphe 1.5.3)

### 1.5.3 Essais cliniques dans le cancer du sein

En 2013 l'oncologie représentait plus de 75% de tous les essais cliniques avec des programmes sur les biomarqueurs et le cancer du sein constituait 28% de tous les essais cliniques. La plupart des essais cliniques en cours ciblent la voie PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/Akt/mTOR et différents récepteurs tyrosine kinase (RTKs pour Receptor Tyrosine Kinases), mais d'autres cibles sont en cours d'investigation.

PI3K/Akt/mTOR est une voie importante impliquée dans la régulation de la survie cellulaire et de la prolifération, et c'est la voie la plus fréquemment altérée dans le cancer du sein. *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2* et *PTEN* sont les gènes essentiels de la voie PI3K/Akt. L'hyperactivation de la voie PI3K se produit dans 70% des cancers du sein et environ 30% ont des mutations de *PIK3CA* (Leroy et al., 2016). Un inhibiteur de PI3K de classe I (GDC0941) est en cours d'évaluation, combiné au fulvestrant, pour les femmes développant un cancer du sein ER+ avancé, qui a progressé suite à une thérapie d'AI (Lee et al., 2015). Le buparlisib (ou BKM120), est un inhibiteur de PI3K étudié chez les femmes en période postménopause avec un cancer du sein ER+ avancé et qui semble prometteur (Maira et al., 2012; Godone et al., 2018). Le taselisib est également un inhibiteur de PI3K administré aux patientes ER+ et celles développant un cancer triple-négatif (TNBC pour Triple-Negative Breast Cancer) en combinaison avec l'enzalutamide, un antagoniste de l'AR qui est en phase II d'un essai clinique. Le capivasertib et le MK2206 sont des inhibiteurs d'Akt donnés aux patientes TNBC et celles développant des métastases, respectivement, tous les deux en combinaison avec le paclitaxel. Enfin, le bimiralisib, le

gedatolisib et le vistuservib sont des inhibiteurs de PI3K/mTOR retrouvés dans des essais cliniques incluant des patientes TNBC (Godone et al., 2018; Milošević et al., 2018).

L'inhibition de la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), qui joue aussi un rôle important dans la prolifération cellulaire, est également une bonne stratégie pour augmenter la sensibilité à la chimiothérapie. Un inhibiteur de MEK (MAPK/ERK Kinase, Kune kinase qui active les MAPK), le selumetinib, est en cours d'essai clinique. D'autres molécules jouent un rôle dans la voie de prolifération cellulaire comme les JAK (Janus Kinase) et les transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT). Plusieurs inhibiteurs de JAK sont inclus dans des essais cliniques comme le ruxolitinib, un inhibiteur oral de JAK1/2 qui montre une activité antitumorale prometteuse, combiné à la capecitabine dans les cancers métastatiques du sein HER2-négatifs (O'Shaughnessy et al., 2018). Et il est également en cours d'investigation chez les patientes HER2+ et TNBC.

Une autre stratégie est d'inhiber des récepteurs tyrosine kinase (RTKs), dont fait partie l'oncogène HER2, amplifié dans les cancers du sein et mentionné plus haut. La famille HER est la plus connue des RTKs, constituée de 4 protéines homologues dont le récepteur du facteur croissance épidermique HER1 (EGFR/ErbB1), l'oncogène HER2 (ErbB2/Neu), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4) (Schroeder et al., 2014). Bien que nombreuses thérapies en clinique ciblent déjà la famille HER et en particulier HER2 (Trastuzumab, lapatinib,...) (Badache and Gonçalves, 2006), il existe encore des molécules en cours d'évaluation comme le sapitinib, qui cible les hétérodimères HER2/HER3. De plus, l'afatinib, ciblant HER1, HER2 et HER4, est le seul à être prescrit aux patientes TNBC comme thérapie néoadjuvante en combinaison avec le paclitaxel. Par ailleurs, la famille du récepteur du facteur de croissance des fibroblastes FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) comprend quatre RTKs transmembranaires utilisées comme cibles. La voie FGFR est impliquée dans la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la migration et l'apoptose (Haugsten et al., 2010). AZD4547 est un inhibiteur de FGFR1-3 utilisé en essai clinique de phase II pour les patientes ER+ ou HER2-négatives et les cancers du sein métastatiques. Il a été évalué comme monothérapie ou en combinaison avec des inhibiteurs de l'aromatase ou le fulvestrant. D'autres essais de phase I pour l'inhibition de FGFR1-4 en combinaison avec le fulvestrant et le palbociclib sont en cours.

Des études ont démontré que les récepteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) pouvaient être de bonnes cibles dans le cancer du sein, et en particulier dans les TNBC, ainsi une thérapie combinée ciblant MET et EGFR pourrait apporter des bénéfices aux patientes porteuses d'une tumeur basal-like et TNBC (Kim et al., 2014).

Comme mentionné précédemment, le bicalutamide et l'enzalutamide sont des inhibiteurs du récepteur à l'androgène (AR) qui sont en essais cliniques chez les patientes développant un cancer TNBC et métastatique. Des essais de phase I/II évaluent actuellement ces deux médicaments ainsi que l'Enobosarm pour le traitement des tumeurs métastatiques AR+. De plus un essai de phase II a rapporté un taux de bénéfice clinique de 6 mois de 19% avec le bicalutamide chez les patientes AR+ (Gucalp et al., 2013).

Les inhibiteurs de PARP sont les agents qui ciblent les cancers TNBC plus qu'aucun autre sous-type de cancer du sein. En effet, comme mentionné précédemment, les PARPs sont de parfaites cibles dans les cancers du sein mutés pour BRCA1/2 et un tiers de ces cancers mutés sont des TNBC (Peshkin et al., 2011). Un essai clinique de phase II a évalué le velirapib en combinaison avec le carboplatine chez les femmes qui présentent un cancer du sein de stade II et III. Cette combinaison, administrée en deuxième ligne après une thérapie standard, a montré de réels bénéfices sur la réponse pathologique complète en comparaison avec une seule thérapie standard et ce, uniquement dans les tumeurs TNBC (Rugo et al., 2016)

Récemment, des approches d'immunothérapie ont vu le jour dans le cancer du sein et représentent une nouvelle stratégie pharmacologique. L'immunothérapie la plus connue est celle basée sur l'inhibition de PD-1/PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) avec le nivolumab et le pembrolizumab déjà approuvés pour certains cancers ; d'autres sont en cours d'évaluation. Cependant le rôle de PD1/PD-L1 dans chacun des sous-types de cancers du sein reste controversé et doit être encore étudié. Le bénéfice de cette immunothérapie dans le cancer du sein est discuté dans plusieurs revues (Hartkopf et al., 2016; Bertucci and Gonçalves, 2017; Solinas et al., 2017; Vonderheide et al., 2017).

La liste des thérapies ciblées en cours d'essais cliniques est loin d'être exhaustive. De nombreuses études et de recherches de biomarqueurs moléculaires sont actuellement en

cours afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein (Godone et al., 2018).

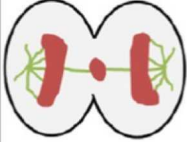

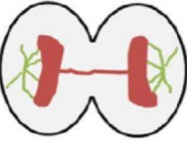




## 2. La mitose

La mitose, ou division cellulaire, est un processus conservé dans l'évolution qui est nécessaire à la croissance et au développement des cellules de l'organisme. Des aberrations dans la division cellulaire sont fréquemment retrouvées dans les cancers, c'est pourquoi les acteurs impliqués dans la mitose sont des cibles thérapeutiques anti-cancer depuis des dizaines d'années.

### 2.1 Aneuploïdie, CIN et cancer

L'aneuploïdie est une notion proposée en 1914 par Theodore Boveri qui se définit par une altération dans le nombre de copies et/ou l'intégrité structurale des chromosomes. L'aneuploïdie a été reconnue comme étant une des caractéristiques principales des cancers depuis plus de 100 ans et elle est fortement élevée dans les cancers du sein, en particulier le cancer du sein canalaire sporadique dans lequel elle représente 65 à 90% des tumeurs examinées (Wiesener et al., 1998; Arnerlöv et al., 2001; Li et al., 2002a, 2002b). Elle a également été détectée à de fortes fréquences (67-78%) dans les carcinomes du sein canaux *in situ* de sous-types intermédiaires et de hauts grades (Leal and Ott, 1995; Ottesen et al., 1995). En réalité, approximativement 90% des tumeurs solides sont aneuploïdes (Weaver and Cleveland, 2006).

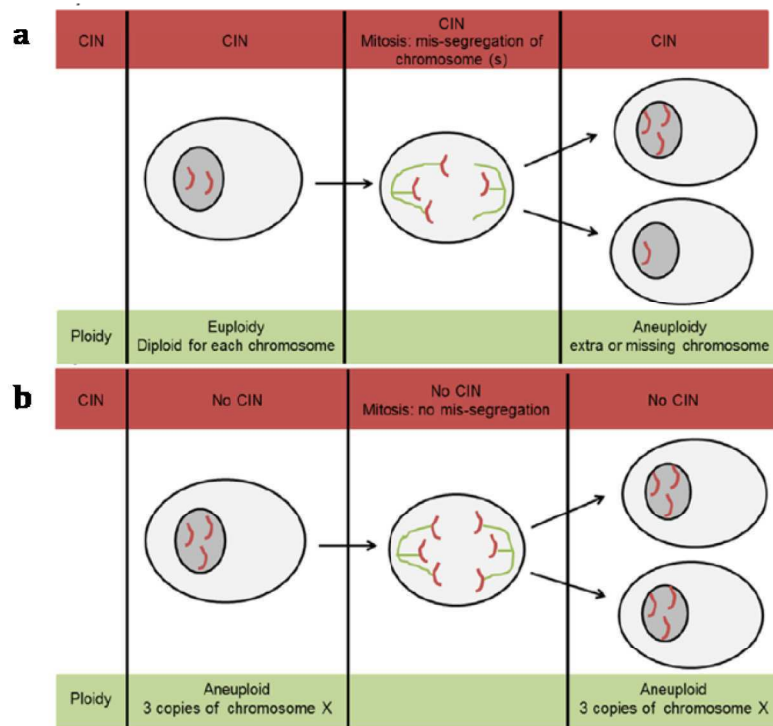
L'aneuploïdie peut résulter d'une instabilité chromosomique (CIN), qui est un processus dans lequel les cellules subissent des défauts de ségrégation des chromosomes lors de la mitose (**Figure 10**).

Effect of CIN	Lagging chromosome	Chromosome mis-alignment	Anaphase bridges	Monopolar spindle
				
Effect of CIN	Multipolar spindle	Micronuclei	Multinucleated cells	Other effects
				Several effects of CIN are only quantifiable if observed over time.

**Figure 10** : Tableau de différents défauts de ségrégation des chromosomes et autres effets de l'instabilité chromosomique.

(D'après Schukken and Foijer, 2017)

Les notions de CIN et d'aneuploïdie sont utilisées de façon interchangeable mais il existe pourtant une différence. L'aneuploïdie est un état génétique, tandis que l'instabilité chromosomique est un comportement cellulaire qui mène à l'aneuploïdie. Les cellules peuvent être aneuploïdes sans exposer de CIN, c'est le cas de cellules dont le caryotype ne change pas au fil du temps, résultant en une population de cellules qui affichent exactement le même caryotype (exemple de la trisomie 21 ; ces cellules sont aneuploïdes sans présenter de mauvaise ségrégation des chromosomes) (Schukken and Foijer, 2018) (**Figure 11**).



**Figure 11 :** Différence entre CIN et aneuploïdie. Cellule diploïde présentant une instabilité chromosomique qui subit une ségrégation anormale des chromosomes et devient aneuploïde **(a)**. Cellule aneuploïde qui ne présente pas de CIN et qui se divise correctement **(b)**.

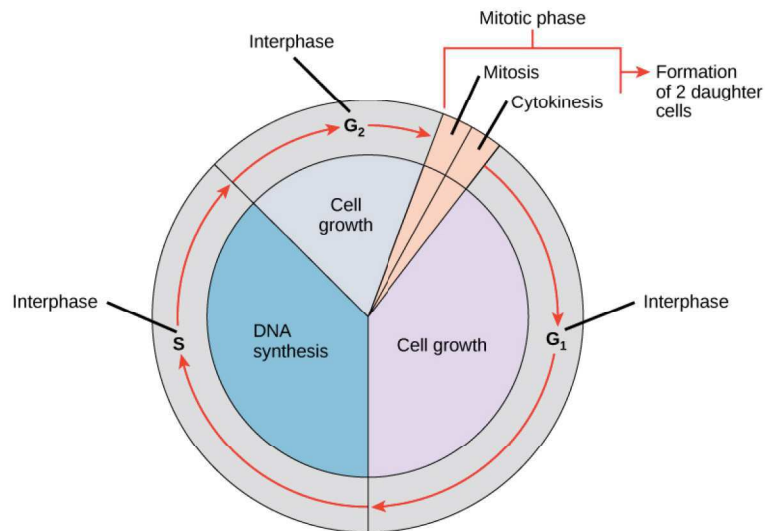
(D'après Shuckken and Foijer, 2017)

L'exactitude de la mitose donc est primordiale pour maintenir un caryotype normal (Pfister et al., 2018). En effet l'intégrité du génome est basée sur la division égale de chromosomes répartis dans les deux cellules filles pendant la division cellulaire.

## 2.2 Les différentes étapes de la mitose

En 1858 le pathologiste Rudolph Virchow a proclamé la doctrine suivante : « *OMINIS CELLULA E CELLULA* ». Cette doctrine est fondée sur l'étude d'un organisme unicellulaire ou d'un animal aussi complexe que l'Homme dont le produit est le résultat d'une répétition de cycles de croissance cellulaire et de division. La plupart des cellules eucaryotes passeront par une série ordonnée d'évènements dans laquelle la cellule duplique son contenu et ensuite se divise en deux cellules filles. Ce cycle de duplications et de divisions est appelé le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est constitué de deux étapes majeures : l'interphase et la mitose (M). L'interphase, la phase la plus longue du cycle cellulaire, commence par la phase G1 (gap1) durant laquelle la cellule grossit et produit

les protéines nécessaires à la duplication de son génôme en phase S (phase de synthèse). En phase G<sub>2</sub> (Gap<sub>2</sub>) la cellule synthétise les protéines nécessaires à la mitose. Lors de l'interphase, le génôme est répliqué et le centrosome est dupliqué (**Figure 12**).



**Figure 12** : Le cycle cellulaire.

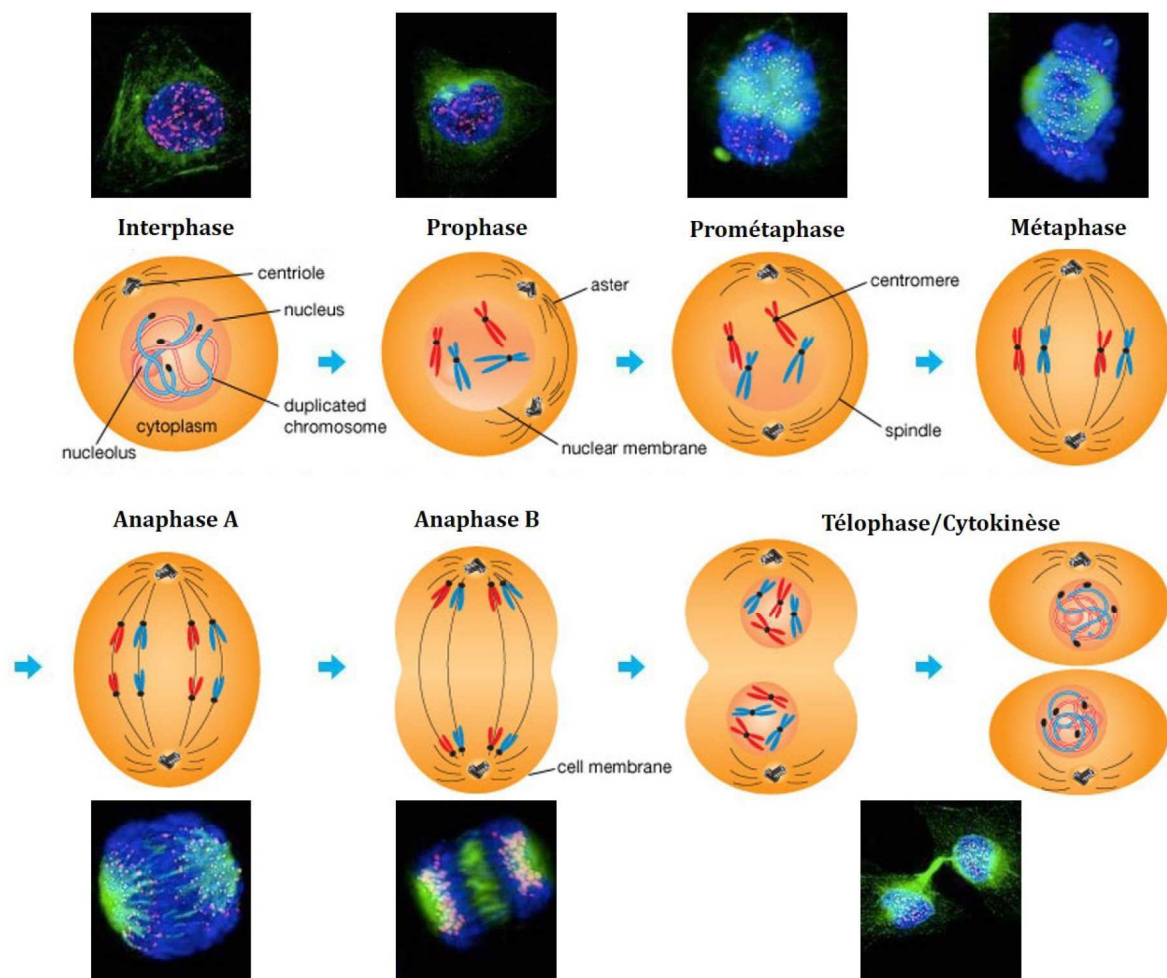
(D'après OpenStax 10.2 : The Cell Cycle)

Bien que les étapes de la mitose ne soient pas parfaitement identiques selon les organismes, les processus fondamentaux qui assurent une ségrégation fidèle des chromatides sœurs sont conservés chez tous les eucaryotes. Ces événements de la mitose incluent la condensation des chromosomes, la formation d'un fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes au fuseau de MTs. Les chromatides sœurs se séparent et partent vers des pôles opposés du fuseau et de nouveaux noyaux se forment dans les deux cellules filles. La mitose est divisée en quatre phases différentes : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (**Figure 13**).

Le début de la **prophase** est marqué par la condensation des chromosomes, qui sont chacun constitué de deux chromatides sœurs, l'une ayant été synthétisée au cours de la phase S. Ces nouvelles molécules d'ADN répliquées restent entremêlées tout au long des phases S et G<sub>2</sub> et se démêlent lors du processus de condensation de la chromatine. Les deux chromatides sœurs condensés sont maintenues ensemble au niveau du centromère, qui est une séquence d'ADN au niveau de laquelle des protéines se fixent pour



former le kinétochore, un site d'attachement du fuseau de MTs (centromère et kinétochore seront détaillés au paragraphe 2.3.2). En plus de la condensation des chromosomes, le cytoplasme change permettant l'assemblage du fuseau mitotique lors de la prophase. Les centrosomes, qui ont été dupliqués lors de l'interphase, se séparent et migrent à des sites opposés du noyau. Ils constituent les deux pôles du fuseau mitotique, qui commence à se former en fin de prophase. La fin de la prophase correspond à la rupture de l'enveloppe nucléaire.



**Figure 13 :** Les étapes de la mitose.

(D'après Encyclopaedia Britannica, 2015<sup>9</sup> et OKILAB)

<sup>9</sup> <https://www.britannica.com/science/mitosis/images-videos>

Les cellules entrent ensuite en **prométaphase**, une transition entre la prophase et la métaphase. Lors de la prométaphase, les MTs du fuseau mitotique (fibres kinétochoriennes), provenant des deux pôles de la cellule, s'attachent aux kinétochores des chromosomes condensés. Il va alors se mettre en place un phénomène de polymérisation/dépolymérisation des MTs kinétochoriens, appelé « fishing », jusqu'à ce que tous les chromosomes soient alignés sur la plaque métaphasique au centre du fuseau. A ce stade les cellules sont arrivées en métaphase.

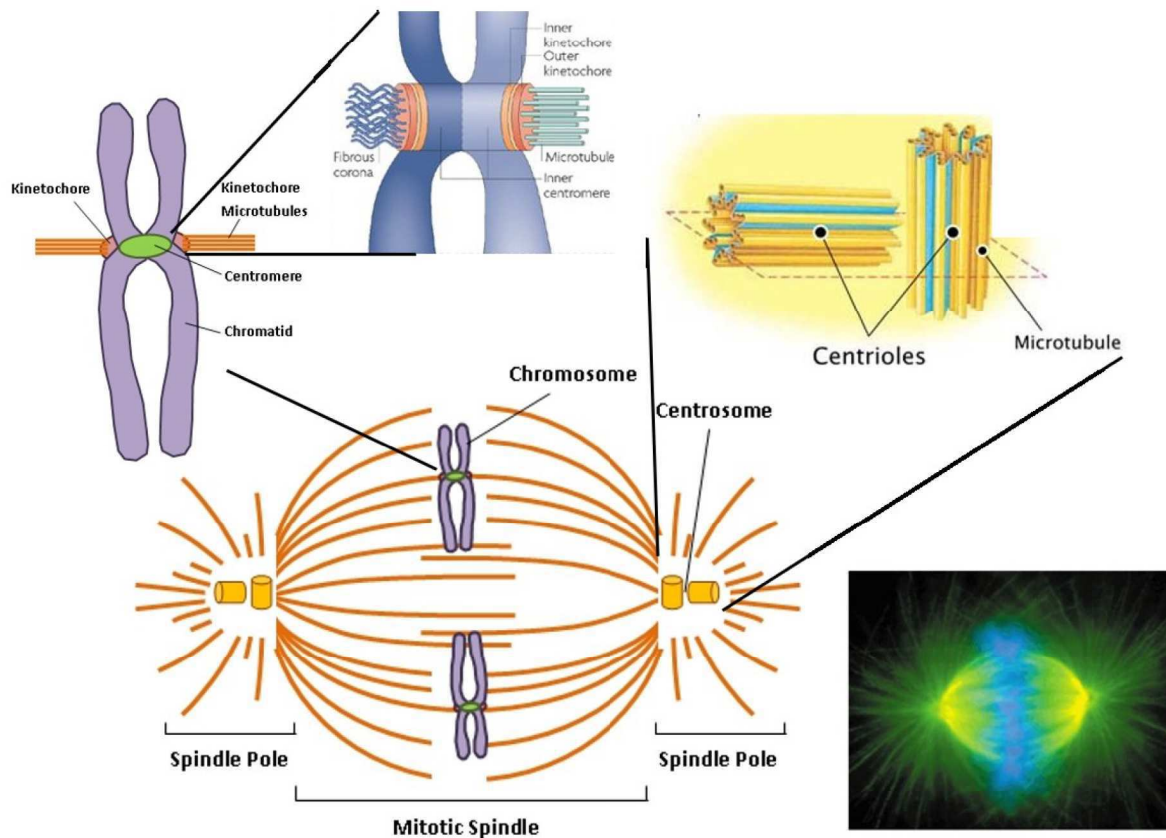
La **métaphase** correspond donc au stade au cours duquel les chromosomes sont alignés et attachés de façon bipolaire au fuseau mitotique. L'attachement des kinétochores aux microtubules est sous la surveillance du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, le SAC (Spindle Assembly Checkpoint). Ce dernier bloque la progression de la mitose tant que les kinétochores ne sont pas tous bien attachés au fuseau de MTs. Ce processus sera décrit plus en détails au chapitre **2.3**.

Le SAC est inactivé une fois que les chromosomes sont correctement attachés au fuseau et sous tension, les cellules entrent alors en **anaphase**, qui se déroule en deux phases : l'anaphase A et l'anaphase B. En anaphase A, la cohésion des chromatides sœurs est rompue par dégradation de la cohésine qui les maintenait ensemble au niveau des centromères. Les chromatides sœurs migrent chacune vers les pôles opposés sous l'action des microtubules kinétochoriens qui se raccourcissent par dépolymérisation. En anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge et forme un faisceau de microtubules appelé fuseau central qui se met en place entre les deux futures cellules filles. Ce faisceau de microtubules participe à la mise en place et au positionnement du site de clivage.

Enfin, la mitose se termine par la **télophase** lors de laquelle l'enveloppe nucléaire se reforme et les chromosomes se décondensent. La séparation des deux cellules filles se produit par un processus d'invagination de la membrane plasmique et par une étape de cytokinèse, appelée abscission, qui permet de cliver les deux cellules filles.

### 2.3 La métaphase : une étape cruciale

La métaphase est l'étape de la mitose lors de laquelle les chromosomes sont tenus par le fuseau mitotique et alignés sur la plaque métaphasique. Les éléments qui constituent cette étape importante sont le fuseau mitotique qui sera décrit ci-après (paragraphe **2.4**), les chromosomes et les pôles du fuseau (les centrosomes) (**Figure 14**).



**Figure 14** : Les éléments essentiels qui constituent l'étape de métaphase.

(D'après Wittman et al, 2001; Cheeseman and Desai, 2008; Pearson Education, 2008; Diamantina Institute, University of Queensland<sup>10</sup>)

## 2.3.1 Le centrosome

Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules dans les cellules animales. La formation du fuseau mitotique nécessite deux centrosomes qui sont formés par duplication du centrosome préexistant. Chaque centrosome est composé de deux centrioles qui sont entourés de matériel péricentriolaire (PCM). Les centrioles sont des structures cylindriques, constituées de neuf triplets de microtubules très stables (**Figure 14**). La duplication s'effectue lors de l'interphase en G1 et aboutit à deux centrosomes composés chacun de deux centrioles qui restent connectés jusqu'en fin de phase G2. Au démarrage de la mitose, les protéines du PCM (la péricentrine, Cep152, Cep192, Cep215, Cdk5RAP2, SPD-5) sont recrutées au niveau des centrioles matures et sont impliquées

<sup>10</sup><https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/cell-and-molecular-biology-experiences/mitosis-movies/background-mitosis-movies>

dans la séparation des deux centrosomes et la formation du fuseau mitotique par nucléation des microtubules (Nigg and Stearns, 2011; Woodruff et al., 2014).

Le PCM est l'élément clé permettant la nucléation des microtubules du fuseau. Son composant principal est le  $\gamma$ TURC ( $\gamma$ -Tubulin Ring Complex), un complexe en anneau composé de  $\gamma$ -tubuline et de protéines GCP (gamma complex proteins). Les microtubules sont nucléés grâce au  $\gamma$ TURC, des protéines du PCM (CdkRap2, Cep152, la péricentrine) et d'autres effecteurs additionnels (TPX2, chTOG) jouant un rôle dans l'activation de la nucléation ou dans l'ancrage des microtubules aux centrosomes (Woodruff et al., 2014; Fry et al., 2017). La maturation et les fonctions du PCM sont régulées par des kinases mitotiques telles que Plk1 (Polo-Like 1) et Aurora kinase A, qui seront développées dans le chapitre 2.5. La kinase mitotique Plk1 phosphoryle plusieurs protéines du PCM comme la péricentrine, permettant l'initiation de la maturation des centrosomes, tandis qu'une inhibition de Plk1 empêche l'accumulation de la  $\gamma$ -tubuline et de CEP192 aux centrosomes et l'assemblage du PCM (Lee and Rhee, 2011). Aurora kinase A (AurKA) est également nécessaire à la maturation du PCM et participe à ses fonctions en régulant des protéines associées aux MTs (MAPs) et impliquées dans la nucléation des MTs (Hannak et al., 2001; Dutertre et al., 2002).

### 2.3.2 Le centromère et le kinétochore

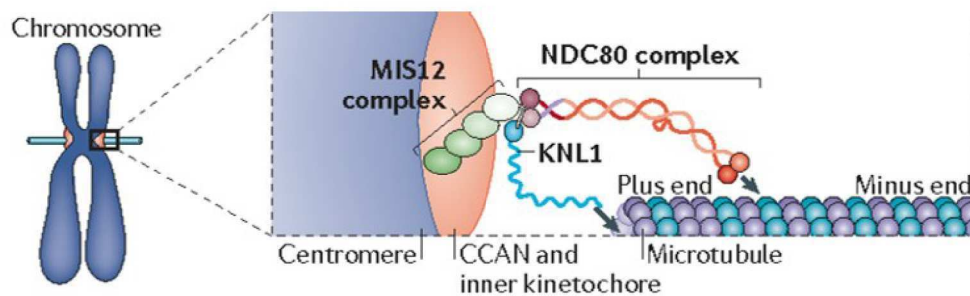
Le centromère est une région du chromosome constituée de séquences nucléotidiques fortement répétées appelées ADN satellite et de séquences pouvant se déplacer dans le génome appelées éléments transposables. Plusieurs protéines sont enrichies au niveau de cette région comme CENP-A (Centromeric Protein A), un variant de l'histone H3 (Earnshaw and Rothfield, 1985) nécessaire à la ségrégation des chromosomes et le complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) (Vader et al., 2006), un complexe constitué d'Aurora Kinase B, INCENP, Borealin et Survivine, qui orchestre plusieurs processus lors de la mitose tels que l'alignement des chromosomes, la modification des histones et la cytokinèse.

Le kinétochore est une structure qui repose sur le centromère et qui est composée de deux lamelles appelées « inner » kinétochore et « outer » kinétochore. L'« inner » kinétochore est juxtaposé à la chromatine centromérique, tandis que l'« outer » kinétochore est plus

éloigné de la chromatine et est directement lié aux microtubules (Musacchio and Desai, 2017).

L'« inner » kinétochore est impliqué dans le recrutement de protéines de l'« outer » kinétochore et participe à la congression des chromosomes. Il correspond à un complexe multiprotéique appelé CCAN (Constitutive Centromere Associated Network), composé d'une quinzaine de protéines appelées CENPs (CENtromeric Proteins) (Hori et al., 2008; Amano et al., 2009). Contrairement à l'« outer » kinétochore, ce complexe est localisé sur les centromères tout le long du cycle cellulaire.

L'« outer » kinétochore est une plateforme d'ancrage des extrémités (+) des microtubules kinétochoriens. Il transmet aux chromatides la force générée par la dépolymérisation des microtubules, ce qui permet leur mouvement vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. L'« outer » kinétochore se forme au moment de la prophase et se dissocie en fin de mitose. Il correspond à un complexe appelé KMN (Knl1, Mis12 et Ndc80), lui-même divisé en trois sous-complexes ayant des fonctions différentes. Le complexe mis12 promeut l'assemblage du complexe KMN et fait le lien avec l'« inner » kinétochore (Cheeseman, 2004; Obuse et al., 2004; Chan et al., 2005; Kline et al., 2006). Le complexe ndc80 est le principal récepteur des microtubules du kinétochore, en effet il fait le lien avec les microtubules en interagissant directement avec les monomères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  des microtubules (Janke, 2001; Wigge and Kilmartin, 2001; McClelland, 2003; McClelland et al., 2003; Wei et al., 2005). Enfin, la sous-unité knl1 est peu structurée mais elle contient des sites de fixation pour les phosphatases PP1 et PP2 (Protein Phosphatase), ainsi que des répétitions MELT (Met-Glu-Leu-Thr) nécessaires au recrutement des protéines régulatrices du SAC (Desai, 2003; Liu et al., 2005; Cheeseman et al., 2006, 2008; Przewlaka et al., 2007; Musacchio, 2015) (**Figure 15**).



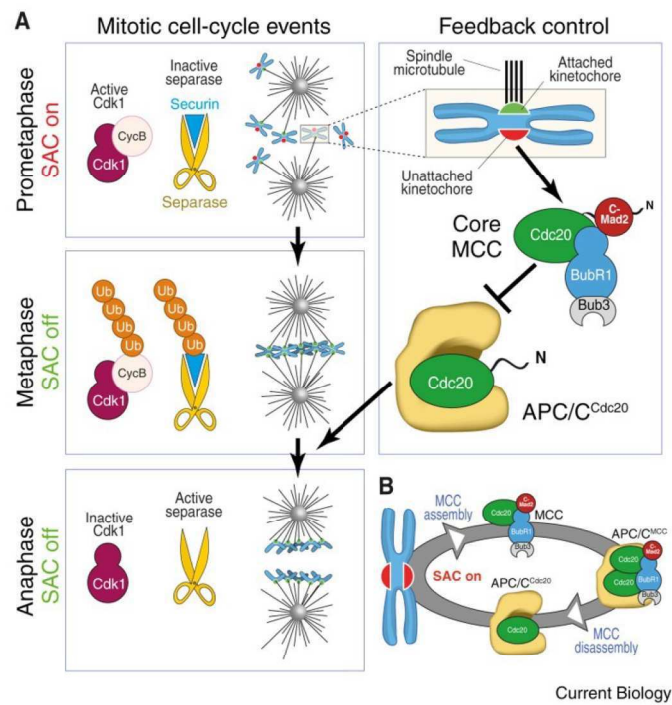
**Figure 15** : Schéma représentant le complexe KMN de l'« outer » kinétochore.

(D'après Foley and Kapoor 2012)

### 2.3.3 Contrôle de la métaphase par le SAC

La métaphase est une étape cruciale au cours de laquelle tous les chromosomes doivent être correctement attachés au fuseau de MTs pour pouvoir poursuivre la mitose. Ce processus est contrôlé par le SAC (Spindle Assembly Checkpoint), qui empêche les chromatides de se séparer jusqu'à ce que tous les kinétochores aient attaché tous les microtubules kinétochoriens du fuseau (Compton, 2011). La régulation précise de ce point de contrôle est un processus moléculaire qui assure une fidélité dans la ségrégation des chromosomes. Le SAC empêche la perte de cohésion des chromatides sœurs et évite une ségrégation prématurée des chromosomes avec des chromosomes non attachés ou attachés au fuseau de façon incorrecte. Un dysfonctionnement du SAC peut induire la formation de cellules aneuploïdes et conduire à la tumorigenèse (Li and Zhang, 2009). Les acteurs principaux du SAC sont les kinases sérine/thréonine MPS1 (Monopolar Spindle 1), Bub1 (Budding Uninhibited by Benomyl 1), BubR1 (Bub1-Related 1) et les protéines MAD1, MAD2 (Mitotic Arrest Deficient 1 et 2) et Bub3. Ces protéines du SAC sont recrutées au niveau des kinétochores non attachés et génèrent un signal qui inhibe l'activité ubiquitine ligase de l'APC/C (Taylor et al., 2004). L'APC/C (anaphase-promoting complex) est une ubiquitine E3 ligase régulatrice du SAC activée par deux co-facteurs Cdc20 et Cdh1 qui ciblent différents substrats pour la protéolyse. Notamment, Cdc20 active la destruction de la sécurine et des cyclines mitotiques via l'APC/C. Lorsque le SAC est activé, l'APC/C ne dégrade donc plus ni la sécurine, qui préserve la cohésion des chromatides sœurs, ni la cycline B, une sous-unité de CDK1 empêchant une sortie de mitose. Le principal inhibiteur de l'APC/C est le MCC (Mitotic Checkpoint Complex), constitué de MAD2, BubR1, Bub3 et du co-facteur Cdc20 de l'APC/C. Le complexe MCC séquestre une

grande fraction de Cdc20, ce qui diminue sa quantité disponible pour l'activation de l'APC/C (Izawa and Pines, 2012) (**Figure 16**).



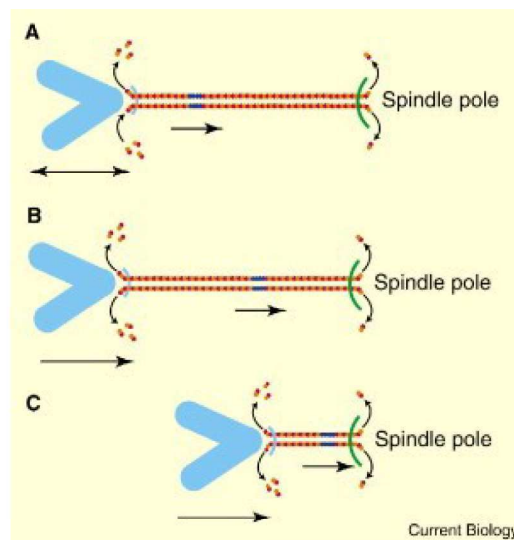
**Figure 16 :** Mécanisme du SAC. La mitose est mise en place par l'activation du complexe Cdk1/Cycline B. Le SAC est actif en prometaphase quand les chromosomes sont attachés au fuseau mitotique. Les kinétochores proprement attachés (en vert) satisfont le SAC et stoppent son signal. Les kinétochores mal attachés (en rouge) génèrent le signal du SAC. C'est alors que le MCC se lie à l'APC/C<sup>Cdc20</sup>, nécessaire à la transition métaphase-anaphase, et empêche l'entrée en anaphase. Quand le SAC est satisfait par l'attachement de tous les kinétochores en métaphase, l'activation de l'APC/C<sup>Cdc20</sup> promeut l'ubiquitination et la protéolyse de la Cycline B et de la sécurine. Leur destruction démarre la sortie de mitose et la séparation des chromatides sœurs.

(D'après Musacchio, 2015).

Lorsque tous les kinétochores sont attachés correctement au fuseau de MTs, le SAC doit être inactivé pour permettre le passage de la cellule en anaphase. Le premier mécanisme qui permet la dissociation des protéines du SAC du kinétochore requiert l'action des phosphatases PP1 et PP2A, qui sont recrutées au kinétochore par Knl1, une protéine du kinétochore. Ces deux phosphatases déphosphorylent Knl1, ce qui abolit l'interaction de Knl1 avec Bub1, Bub3 et BubR1 (Espert et al., 2014; Nijenhuis et al., 2014). Un autre mécanisme d'inactivation du SAC passe par le déplacement de l'hétérodimère MAD1/MAD2 du kinétochore vers les pôles par le complexe dynéine/dynactine. Cette

délocalisation du complexe a pour effet l'arrêt de la formation du MCC et donc de l'inactivation du SAC ( Howell et al., 2001; Gassmann et al., 2010).

Le SAC ne contrôle pas seulement l'attachement des chromosomes au fuseau de microtubules mais également l'état de tension généré à l'interface kinétochore/microtubule. Les forces de tension sont nécessaires pour l'alignement des chromatides sur la plaque métaphasique. Les forces de traction des kinétochores en métaphase dépendent de l'état de polymérisation ou dépolymérisation des microtubules kinétochoriens et de l'existence d'un flux de microtubules vers les pôles au niveau du fuseau. Dans les cellules animales les kinétochores sont animés par l'alternance de phases de polymérisation et de dépolymérisation des microtubules kinétochoriens, ce qui cause une oscillation des chromosomes sur la plaque métaphasique. Au moment de l'anaphase, avec une perte de tension au niveau du centromère, les microtubules kinétochoriens persistent dans un état de dépolymérisation à une de leurs extrémités et les chromosomes sont tirés vers les pôles, à la fois par une activité « Pacman » aux kinétochores et par le flux de microtubules (**Figure 17**).





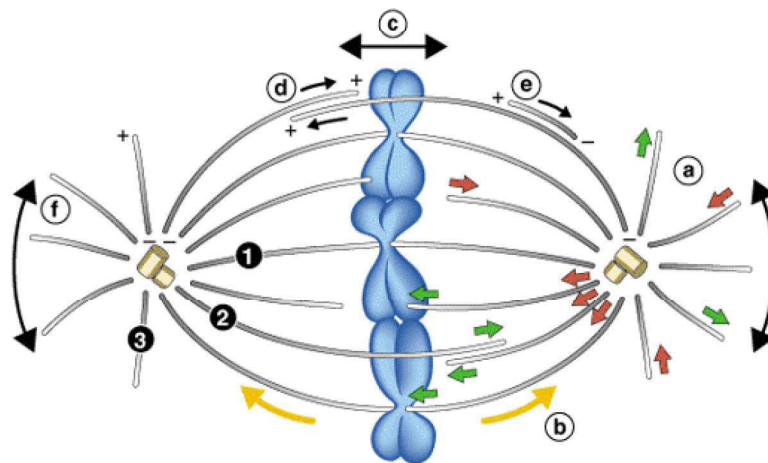
**Figure 17:** Flux des microtubules kinétochoriens et instabilité directionnelle des kinétochores en métaphase (A) et en anaphase (B-C). (A) En métaphase, les sous-unités de tubulines sont continuellement enlevées du bout (-) aux pôles tandis que les kinétochores sont animés par une alternance de phases de polymérisation et de dépolymérisation. Ceci résulte en une oscillation des chromosomes sur la plaque métaphasique pendant qu'un flux de tubuline se dirige vers les pôles. (B-C) En début d'anaphase, les kinétochores ne sont plus qu'animés par des phases de dépolymérisation des MTs engendrant un mouvement des chromosomes vers les pôles (« Pacman ») qui sont tirés par la dépolymérisation continue des MTs aux pôles (traction).

(D'après Khodjakov and Kapoor, 2005)

### 2.4 Le fuseau mitotique

#### 2.4.1 Description

Le fuseau mitotique a été décrit pour la première fois en 1882 par l'allemand Walther Flemming, un pionnier de la recherche sur la mitose. L'élément fondamental de la structure du fuseau mitotique est une série de microtubules antiparallèles avec leurs bouts (-) fixés au pôle du fuseau et leurs bouts (+) projetés en direction des chromosomes (Wittmann et al., 2001). Les extrémités sont dynamiques et passent sans cesse d'un état de polymérisation à un état de dépolymérisation, quant aux mailles des MTs, elles servent à traquer les protéines motrices, telles que la dynéine et les kinésines. Ces protéines convertissent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Adenosine TriPhosphate) en un déplacement spatial le long du MT (Hirokawa et al., 1998; Goldstein and Philp, 1999; Kim and Endow, 2000). Il existe 3 sous-populations de microtubules dans le fuseau (**Figure 18**) : (i) les microtubules interpolaire (nK-MTs pour non-kinetochore MTs) qui partent des deux pôles opposés et forment un réseau antiparallèle qui stabilise la bipolarité du fuseau, (ii) les microtubules astraux (A-MTs) qui s'étendent à partir des centrosomes à l'opposé du fuseau kinétochorien, ils sont impliqués dans l'orientation et la position du fuseau et interagissent avec le cortex de la cellule et enfin, (iii) les microtubules kinétochoriens (K-MTs) qui partent des pôles et s'attachent à la partie extérieure des kinétochores (Dumont and Mitchison, 2009; Gadde and Heald, 2004). Cet attachement des K-MTs aux kinétochores les stabilise et résulte en des fibres kinétochoriennes (K-fibre), qui sont impliquées dans le mouvement des chromosomes. Ce processus est contrôlé par le SAC qui, comme décrit précédemment (**2.3.2**), est sous silence une fois que tous les kinétochores sont correctement attachés au fuseau.



**Figure 18** : La structure dynamique du fuseau mitotique. (1) MT kinétochorien, (2) MT interpolaire, (3) MT astral ; (a) Les flèches vertes et rouges représentent respectivement la croissance et la décroissance des MTs ; (b) flux de MTs ; (c) Mouvements de chromosomes ; (d) Glissement de MTs antiparallèles dirigé par des protéines motrices ; (e) Transport sur MT dynéine-dépendant en direction du bout moins ; (f) Mouvement d'orientation des pôles du fuseau.

(D'après Wittmann et al. 2001)

### 2.4.2 Assemblage du fuseau mitotique

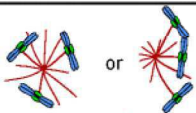
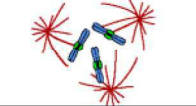
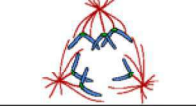
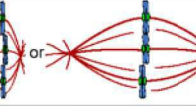
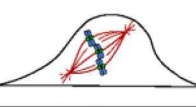
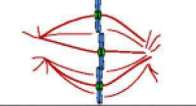
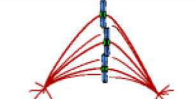
Dans la plupart des types cellulaires, les pôles du fuseau sont connectés aux centrosomes, qui ont été découverts comme étant la première structure cellulaire d'où proviennent les MTs. Cependant certains types cellulaires, comme les cellules de plantes et les cellules méiotiques, ne possèdent pas de centrosome (Dumont and Desai, 2012), et il a été montré que la présence de centrosomes n'est pas indispensable pour la formation du fuseau (Khodjakov et al., 2000). En effet des travaux ont montré que la chromatine pouvait aussi permettre la nucléation des MTs et donc l'assemblage du fuseau, indépendamment des centrosomes (Prosser and Pelletier, 2017). De plus les MTs peuvent également se former directement à partir du fuseau lui-même (Khodjakov et al., 2000; Prosser and Pelletier, 2017). Cette voie de nucléation nécessite tout de même le complexe  $\gamma$ TuRC pour initier la nucléation (Lüders et al., 2006) et dépend des protéines motrices pour organiser les MTs en un réseau bipolaire (Goshima and Vale, 2003).

### 2.4.3 Défauts du fuseau mitotique

Dans une métaphase normale, lors d'une division cellulaire symétrique, le fuseau doit être centré dans la cellule, les chromosomes placés sur la plaque équatoriale et les pôles positionnés de part et d'autre à une distance précise. Une distance optimale assure que les chromatides sœurs puissent se déplacer sur une distance appropriée et suffisante et

de cette façon être incorporées de façon égale dans deux cellules filles lors de la cytokinèse.

Des perturbations du fuseau mitotique peuvent causer des anomalies de mitose conduisant à une mauvaise division cellulaire et sont souvent une source d'aneuploïdie. Il existe plusieurs anomalies du fuseau mitotique, notamment la formation d'un fuseau monopolaire ou multipolaire, ou un défaut dans l'orientation, la forme, la symétrie ou la taille du fuseau (**Figure 19**).

Defect	Appearance	Description
Monopolar spindle		Prometaphase-looking cell with only one spindle pole.
Multipolar prometaphase		Prometaphase-looking cell displaying more than two spindle poles.
Multipolar ana-/telophase		Ana-/telophase cell with more than two spindle poles and in which the chromosomes may be segregating in more than two groups.
Abnormal length		Metaphase cell in which the spindle length deviates from the norm (for the specific cell type).
Mis-oriented spindle		Metaphase cell in which the spindle axis is oriented at an angle with respect to (rather than parallel with) the substrate.
Unfocused/ splayed spindle poles		Late prometa-/ metaphase cell in which the spindle poles are spread over a greater than normal area or in which the spindle pole appears to end at several focal points instead of one.
Bent spindle		Metaphase (or later mitotic stage) cell in which the spindle axis is curved instead of straight.

**Figure 19** : Représentations et descriptions des défauts du fuseau mitotique.

(D'après Baudoin and Cimini, 2018)

Les fuseaux monopolaires, comme leur nom l'indique, n'ont qu'un pôle et un seul réseau de MTs astraux présents en prométaphase. Les fuseaux multipolaires se produisent lorsqu'il y a plus de deux pôles présents lors de la mitose et peuvent être séparés en différentes catégories selon les phases de la mitose lors desquelles ils sont observés (en prométaphase, métaphase et en anaphase/télophase). En effet un fuseau multipolaire

observé en prométaphase peut dans certains cas (centrosomes surnuméraires ou pôle sans centrosome) être converti en fuseau bipolaire plus tard en mitose par un rassemblement (« clustering ») de centrosomes ou par coalescence des pôles (Cimini et al., 2003; Quintyne et al., 2005; Ganem et al., 2009; Silkworth et al., 2009; Marthiens et al., 2012), ce qui toutefois n'empêche pas les défauts d'attachement des chromosomes, qui peuvent conduire à de l'aneuploïdie.

L'orientation du fuseau mitotique est primordiale pour assurer une bonne ségrégation des chromosomes. Elle est importante notamment pour l'établissement de l'épithélium afin de conserver une bonne polarité tissulaire. L'axe pôle-pôle doit être perpendiculaire à l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. Cette orientation est mesurée en calculant l'angle de l'axe du fuseau à partir d'images acquises en Z-stack et ceci en métaphase car dans certains cas l'orientation du fuseau change pendant les phases précoces de la mitose. Un défaut dans l'orientation du fuseau est typiquement lié à une mauvaise interaction entre les MTs astraux et le cortex cellulaire ou à des perturbations des forces de traction entre le cortex cellulaire et la matrice extracellulaire (Théry and Bornens, 2006; Toyoshima and Nishida, 2007; Nain and Cimini, 2013; Meraldi, 2016) . D'autres perturbations dans l'orientation du fuseau ont été rapportées, en particulier dans des cellules déplétées pour Kif25, une kinésine-14 localisée au centrosome, nécessaire au maintien du positionnement du noyau au centre de la cellule (Decarreau et al., 2017) et dans des cellules déplétées pour PEX11B, une protéine associée aux péroxysomes et nécessaire au développement de l'épiderme (Asare et al., 2017).

Tout comme l'orientation du fuseau, sa forme doit être aussi contrôlée pour un bon équilibre en métaphase et pour assurer la séparation des chromosomes en anaphase. Plusieurs modifications dans la forme du fuseau mitotique ont été rapportées dans la littérature et sont pour la plupart causées par des perturbations de l'équilibre dans l'architecture du fuseau, ses forces et ses signaux moléculaires. Quelques exemples de forme de fuseau anormale incluent des pôles « flous » ou étendus et des fuseaux « tordus ». Les cellules ayant des pôles dits « flous », qui ne sont pas concentrés en un point, affichent une apparence semblable à une prométaphase, alors que des fuseaux dits « tordus » sont plus susceptibles d'apparaître en métaphase, anaphase ou télophase. Des pôles « flous » sont le résultat d'une inhibition de l'activité motrice de la dynéine (Gaglio

et al., 1997; Raaijmakers et al., 2013), de NuMA (NUclear Mitotic Apparatus) (Levesque et al., 2003; Silk et al., 2009) ou de la kinésine-14, HSET (Human Spleen Embryonic Tissue) (van Heesbeen et al., 2014). Les fuseaux « tordus » ont été observés en réponse à des perturbations des fonctions de kinésines-14 et kinésines-8 et peuvent se produire de façon concomitante à une augmentation de la taille du fuseau, la forme tordue résulterait alors de la déformation du fuseau qui est trop long pour rentrer dans l'espace cellulaire (Mayr et al., 2007; Cai et al., 2009).

Le fuseau doit être centré dans la cellule en métaphase pour assurer une division équitable par la suite. Le fuseau se positionne au centre de la cellule grâce à l'interaction des MTs astraux, nucléés depuis les pôles, avec le cortex cellulaire et est maintenu grâce à des forces de tractions (Grill and Hyman, 2005). La position du fuseau se mesure à partir d'images acquises en métaphase en calculant les distances cortex-pôle et pôle-cortex. Le fuseau mitotique est bien positionné au centre de la cellule si ces deux distances sont égales. Un défaut dans la position du fuseau en métaphase peut engendrer une ségrégation anormale des chromosomes en anaphase et mener à de l'instabilité chromosomique et à de l'aneuploïdie.

La taille du fuseau est connue pour varier d'une espèce à l'autre en fonction de différents facteurs, y compris la taille de la cellule (Goshima and Scholey, 2010). Cependant pour une cellule donnée, elle est remarquablement conservée en métaphase et peut rester constante pendant de longues périodes, malgré la dynamique importante du fuseau (Goshima et al., 2005b). Il est important que la taille du fuseau soit constante en métaphase pour assurer un bon positionnement des chromosomes au centre de la cellule. Cette taille optimale du fuseau en métaphase assure également que les asters soient séparés d'une certaine distance nécessaire à la machinerie de la cytokinèse pour une séparation correcte des deux cellules filles en fin de mitose. La taille du fuseau mitotique doit impérativement être mesurée lors de la métaphase, car cette taille varie lors des autres étapes de la mitose. Un changement dans la taille du fuseau mitotique doit être quantifié en acquérant des images de métaphase en Z-stack et en mesurant la distance pôle-pôle. Un changement dans la taille du fuseau a été observé dans de nombreux contextes et est typiquement lié à un déséquilibre de forces dans le fuseau et/ou à un changement dans la dynamique des MTs (Goshima et al., 2005b; Tillement et al., 2009;

Prosser and Pelletier, 2017). Les mécanismes de régulation de la taille du fuseau sont décrits ci-dessous.

### 2.4.4 Régulation de la taille du fuseau mitotique

Il existe plusieurs processus mis en place pour contrôler la taille du fuseau dans les cellules humaines. Compte-tenu de l'instabilité dynamique des MTs, le maintien de la taille du fuseau en métaphase résulte d'une balance entre polymérisation et dépolymérisation aux deux extrémités des MTs. De fait, la suppression d'une activité de dépolymérisation des MTs génère des fuseaux plus grands. C'est ce qui a été montré avec Kif2A, MCAK (kinésines-13) et Kif18a (kinésine-8), trois kinésines qui dépolymérisent les MTs (Ganem and Compton, 2004; Mayr et al., 2007; Varga et al., 2009; Domnitz et al., 2012). Il est à noter que Kif2A exerce son activité de dépolymérisation depuis les pôles (Ganem and Compton, 2004), contrairement à MCAK et Kif18a qui sont localisées au kinétochore. L'inhibition d'une activité de dépolymérisation d'une kinésine, qu'elle soit au bout (+) ou (-) des MTs, engendre donc un fuseau mitotique plus grand. A l'inverse, la déplétion de certains acteurs qui participent à la polymérisation des MTs provoque un raccourcissement du fuseau mitotique. On note pour ch-TOG (ou CKAP5 pour Cytoskeleton-associated protein 5), une protéine associée aux MTs (MAP) localisée aux pôles et qui polymérise les MTs, que sa déplétion provoque en effet un fuseau plus court (Cassimeris and Morabito, 2004). De la même façon que pour ch-TOG, la déplétion d'EB1 (End Binding 1), un régulateur majeur du bout (+) des microtubules, engendre un rétrécissement du fuseau (Rogers et al., 2002; Goshima et al., 2005b). Enfin, une perte de CLASP1 (CLIP-associating protein 1), une MAP située aux kinétochores, ou de TPX2 (Targeting Protein for Xklp2), une MAP située au pôle, résulte également en une diminution de la distance pôle-pôle (Goshima et al., 2005b; Fu et al., 2015).

La distance pôle-pôle peut être également contrôlée par les protéines motrices qui se lient et glissent sur les MTs. Parmi ces protéines motrices, on peut noter la kinésine HSET (kinésine-14) et la dynéine. Une déplétion de HSET, qui s'accroche et glisse sur les MTs vers les pôles, provoque un raccourcissement du fuseau (Cai et al., 2009b). Et de façon intéressante, la co-déplétion de Kif18a et HSET résulte en un fuseau de taille similaire à celle des cellules contrôles (Weaver et al., 2011). La dynéine, quant à elle, recrute de nombreux acteurs qui régulent la taille du fuseau (Goshima and Scholey, 2010), en

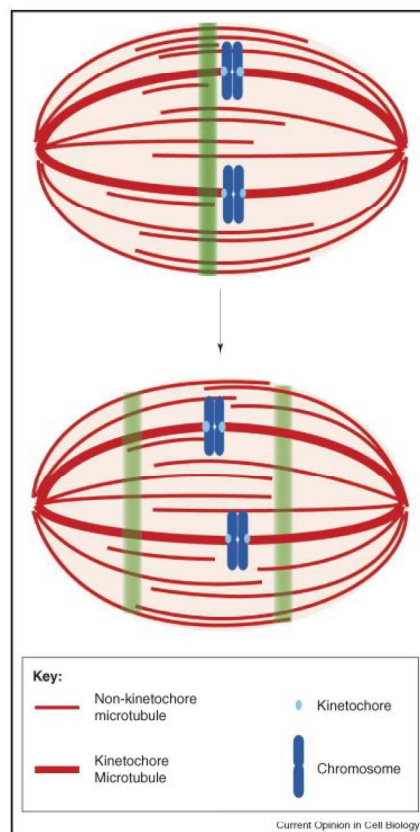
particulier Kif2A au pôle, aussi une déplétion de la dynéine engendre une augmentation de la taille du fuseau (Gaetz and Kapoor, 2004). Ainsi la dynamique du MT et la régulation des protéines motrices des MTs sont deux processus importants pour le contrôle de la taille du fuseau.

D'autres mécanismes sont impliqués dans la régulation de taille du fuseau et ont été étudiés dans plusieurs organismes cellulaires. La déplétion de la  $\gamma$ -tubuline, l'augmine ou la katanine, impliquées dans la nucléation des MTs du fuseau indépendante des centrosomes (**chapitre 2.4.2**), induit la formation d'un fuseau plus long (McNally et al., 2006; Goshima et al., 2008 ; Goshima and Scholey, 2010). La tension entre les chromatides joue également un rôle clé dans le contrôle de la taille du fuseau. La réduction de la cohésion des chromatides sœurs (par déplétion de la cohésine Rad21) (Goshima et al., 2005b) ou de l'interaction kinétochore-MT (par déplétion des kinésines-8 chez la levure) (Garcia et al., 2002; West et al., 2002) engendrent un fuseau anormalement long. A l'inverse une déplétion d'EB1 chez la Drosophile provoque un raccourcissement du fuseau (Rogers et al., 2002; Goshima et al., 2005b). D'autres mécanismes, moins étudiés, peuvent influencer la taille du fuseau, tels que les forces générées au niveau des MTs astraux, la taille du centrosome, un gradient de stabilisation des MTs émanant des chromosomes, ou encore l'influence de la membrane de lamine B qui entoure le fuseau (Goshima and Scholey, 2010).

### 2.4.5 Flux de MTs dirigés vers les pôles (« poleward flux »)

Le maintien de la taille du fuseau mitotique, résultant d'une balance entre les phases de polymérisation aux kinétochores et de dépolymérisation aux pôles, est lié à un concept de plus en plus étudié qui est le flux de MTs dirigé vers les pôles (« poleward flux ») (**Figure 20**). En 1965, Arthur Forer a irradié des régions localisées au niveau du fuseau méiotique des spermatocytes de mouche en utilisant des UV et a observé un mouvement marqué par la réduction d'une biréfringence. Il en a conclu que les MTs kinétochoriens se déplaçaient vers les pôles, disparaissaient puis se recyclaient et que la zone de réduction de biréfringence était un marqueur d'un système continuellement en mouvement. Le flux de MTs a été ensuite démontré pour la première fois par photoactivation de la tubuline fluorescente en 1989 (Mitchison, 1989). C'est un processus conservé dans l'évolution utilisé par les microtubules du fuseau pour déplacer les chromosomes et réguler la taille

du fuseau. Il a été décrit *in vitro* (Sawin and Mitchison, 1991) et *in vivo* (Mitchison, 1989) dans plusieurs types cellulaires de vertébrés y compris le xénope (Mitchison, 1989; Sawin and Mitchison, 1991; Zhai et al., 1995; Waters et al., 1996). Ce flux, dû à une translocation des microtubules vers les pôles et à une balance entre polymérisation/dépolymérisation aux extrémités des MTs, est caractéristique du fuseau mitotique en métaphase et n'est pas observé en interphase (Zhai et al., 1995). Ce flux est modifié en anaphase, phase pendant laquelle les MTs kinétochoriens continuent à se déplacer vers les pôles tandis que les extrémités (+) et (-) ne sont plus qu'animés par une dépolymérisation (Mitchison and Salmon, 1992). De plus ce phénomène est restreint aux MTs kinétochoriens et interpolaire et ne concerne pas les MTs astraux (Waterman-Storer et al., 1998).



**Figure 20 :** Visualisation du flux de MTs dirigé vers les pôles par photoactivation de la tubuline fluorescente au milieu du fuseau.

(D'après Kwok and Kapoor, 2007)

Le flux a majoritairement été étudié chez la drosophile et chez le xénope. Chez ce dernier, des études ont montré que le flux persistait sur le fuseau de MTs en absence de

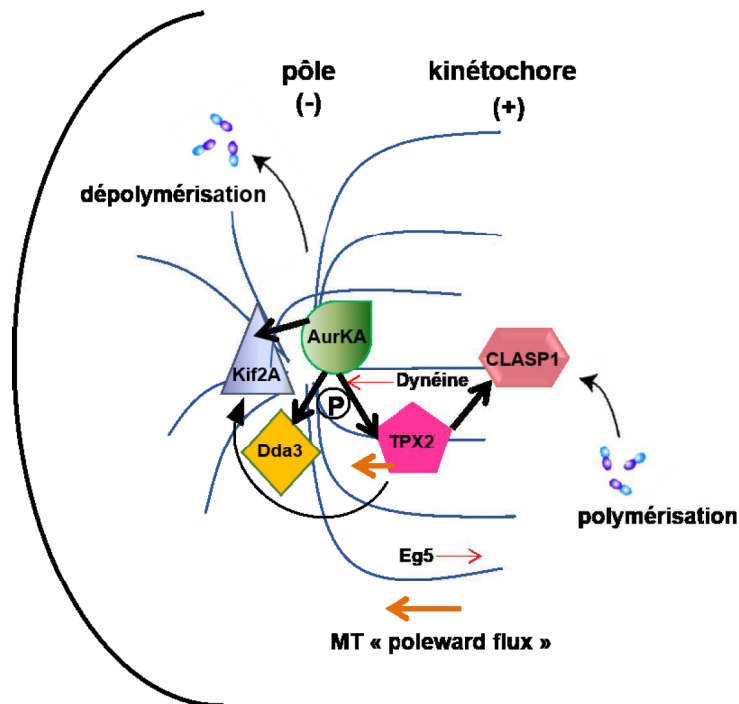


chromosomes et de centrosomes (Sawin and Mitchison, 1994), suggérant que le flux était une propriété intrinsèque au simple réseau de MTs en mitose et qu'il nécessitait la présence de régulateurs comme les protéines motrices. Une des premières kinésines motrices, dont l'implication dans le flux a été observée, est la *ncd* (nonclaret disjunctional), une kinésine-14 chez la *Drosophile*, qui permet la translocation des MTs kinétochoriens vers les pôles (Endow et al., 1994). Une autre kinésine, *Eg5* (kinésine-5) a été au centre de plusieurs études, mais les résultats restent controversés. En effet l'activité d'*Eg5* n'a pas montré d'effet notable sur le flux *in vitro* (Sawin and Mitchison, 1994), mais il a été suggéré qu'elle était responsable de la translocation des MTs sur le fuseau du xénope *in vivo* (Shirasu-Hiza et al., 2004), en exerçant des forces entre les MTs antiparallèles. Dans les cellules *Pkt1*, il semblerait qu'*Eg5* et son glissement sur les MTs antiparallèles ne serait pas nécessaire au mécanisme de flux (Cameron et al., 2006). En fait, l'activité d'*Eg5* doit être couplée à l'action de kinésines qui dépolymérisent les MTs aux pôles (Miyamoto et al., 2004; Kwok and Kapoor, 2007). La lamine B, un filament intermédiaire composant la matrice du fuseau, serait aussi impliquée dans le flux en affectant des protéines motrices comme *Eg5*, mais le mécanisme reste inconnu (Goodman et al., 2010). Parmi les chromokinésines, incluant *Kif4a* et *Kid*, qui sont des protéines motrices associées à la chromatine et se déplaçant vers les extrémités (+), seule *Kif4a* a été montrée comme un régulateur négatif du flux (Wandke et al., 2012).

L'implication des kinésines-13 dans le flux a fait l'objet de nombreuses études. *Kif2A*, par son activité de dépolymérisation aux pôles du fuseau, est un régulateur majeur du « poleward flux ». L'inhibition de *Kif2A* diminue significativement le flux dirigé vers les pôles (Ganem et al., 2005). En revanche, il est intéressant de constater que *MCAK*, qui dépolymérise aussi les MTs et dont la déplétion induit le même phénotype que *Kif2A* sur la taille du fuseau que *Kif2A*, n'est pas impliqué dans le flux. Chez la *Drosophile*, deux kinésines-13, *KLP59D* et *KLP10A* (*Kif2A*), coopèrent pour réguler le flux (Rath et al., 2009). Chez l'homme, *Kif2A* coopère avec un autre composant crucial pour le flux, *CLASP1*, qui exerce une activité de polymérisation aux kinétochores. L'inhibition de *CLASP1* supprime complètement le flux (Maiato et al., 2005; Rogers et al., 2005). *CLASP1* est recrutée par *EB1* au bout (+) et par *CENP-E* aux kinétochores et promeut le flux (Maffini et al., 2009). Ainsi, ces deux protéines, *Kif2A* et *CLASP1*, contrôlent de façon directe le flux dirigé vers les pôles et la taille du fuseau mitotique.

D'autres protéines, moins étudiées, régulent aussi le flux de MTs dirigé vers les pôles. Chez la drosophile, il a été montré que KLP61F, une kinésine-5, est nécessaire au maintien d'une taille normale du fuseau et indispensable au flux (Brust-Mascher et al., 2009), tout comme la spastine et la fidgetine, des protéines qui clivent les MTs (Zhang et al., 2007). D'autres travaux ont montré qu'EB1 ne contribue pas directement à la régulation du flux chez la drosophile mais qu'une réduction de l'activité de ch-TOG, causée par sa propre déplétion ou par la suppression d'EB1, résulte en une inhibition du flux et un raccourcissement du fuseau (Buster et al., 2007). Kronja et al. ont montré que ch-TOG régule le flux chez le xénope en réduisant les temps de pause aux deux extrémités des MTs du fuseau (Kronja et al., 2009). Enfin, une étude récente dans des cellules humaines a mis en évidence que la déplétion du complexe katanine-ASPM (abnormal spindle-like microcephaly associated), localisé au pôle, réduisait fortement la vitesse de flux en métaphase, mais que ceci n'engendrait pas de forts changements dans la taille du fuseau. Par contre, la dissociation du complexe impacte l'orientation du fuseau (Jiang et al., 2017).

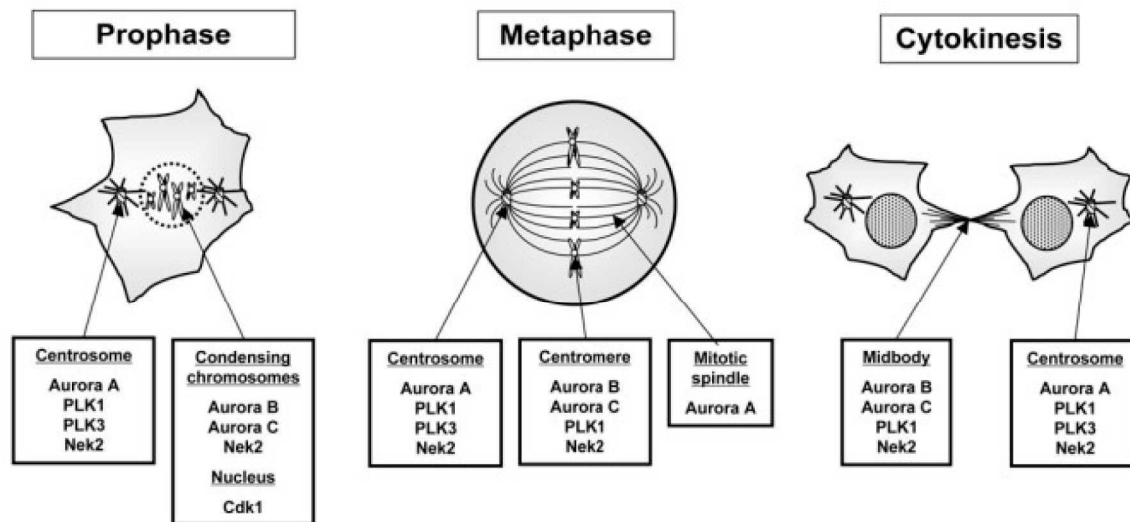
Il existe des protéines qui régulent de façon indirecte le flux en contrôlant la localisation et l'activité des acteurs cités précédemment, comme par exemple la dynéine, Dda3 (Differential Display and activated by p53), AurKA et TPX2 (**Figure 21**). La dynéine et Dda3, des protéines associées aux MTs motrice et non motrice, respectivement, recrutent Kif2A au pôle et par conséquent maintiennent son activité de dépolymérisation et contrôlent ainsi la taille du fuseau mitotique ainsi que le flux de MTs (Gaetz and Kapoor, 2004). La dynéine recrute en parallèle CLASP1 aux kinétochores, permettant l'incorporation de la tubuline sur les MTs kinétochoriens (Reis et al., 2009). Mdp3 (microtubule-associated protein 7 domain-containing 3 ; MAP7D3) régule le flux de MTs en régulant négativement le complexe formé entre Kif2A et Dda3 (voir paragraphe 5.2.3) (Kwon et al., 2016). AurKA, quant à elle, phosphoryle TPX2 (Fu et al., 2015), un substrat et un activateur d'AurKA, mais aussi Eg5, une kinésine motrice (Wang et al., 2008) et Kif2A (Jang et al., 2009). Ces phosphorylations par AurKA sont essentielles pour le maintien d'un flux normal et d'une taille du fuseau correcte en métaphase. L'effet d'un mutant non phosphorylable de TPX2 sur le raccourcissement de la taille du fuseau et sur la diminution de la vitesse du flux de MTs est restauré par une co-déplétion de ses deux partenaires d'interaction, CLASP1 et Kif2A (Fu et al., 2015).



**Figure 21** : Acteurs principaux du MT "poleward flux" dans le maintien de la taille du fuseau mitotique.

## 2.5 Régulation de la mitose par la kinase mitotique, Aurora Kinase A

Le cycle cellulaire est étroitement contrôlé par plusieurs familles de kinases incluant les CDKs (Cyclin-Dependent Kinases), Plks (Polo-Like Kinases), NEKs (NIMA-related Kinases) et Aurora kinases. Les fonctions de chaque kinase sont étroitement liées à leurs localisations pendant la progression de la mitose (**Figure 22**) (Li and Li, 2006; Nasa and Kettenbach, 2018; Nigg, 2001; Welburn and Jeyaprakash, 2018). Ce chapitre se focalisera sur les kinases de la famille Aurora.

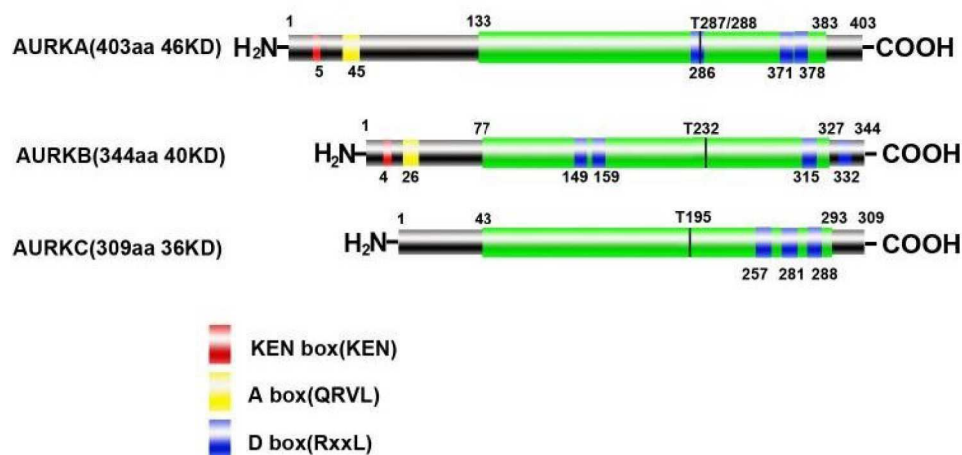


**Figure 22 :** Localisation des kinases mitotiques majeures dans les phases de la mitose.

(D'après Salaün, et al, 2008)

### 2.5.1 La famille des Aurora Kinases

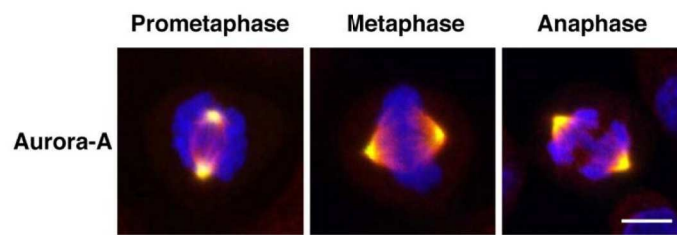
La famille des kinases Aurora est une famille de sérine/thréonine kinases conservée dans l'évolution, d'abord découverte chez la levure (Chan and Botstein, 1993), qui est composée de trois membres chez les mammifères, Aurora A, Aurora B et Aurora C (Bernard et al., 1998; Prigent et al., 1999). Les trois protéines partagent la même structure avec un domaine catalytique situé dans la partie C-terminale et un domaine N-terminal qui varie en taille, le plus long étant retrouvé chez Aurora A (AurKA) et le plus court chez Aurora C (AurKC) (**Figure 23**). Elles sont actives une fois phosphorylées sur leur thréonine présente dans leur domaine catalytique. Cette phosphorylation correspond à une autophosphorylation qui est stimulée par la fixation de substrats. Une fois les Aurora kinases activées, un changement de conformation de leur site actif opère, ce qui induit en même temps une protection de la thréonine phosphorylée qui n'est plus accessible aux phosphatases, comme par exemple PP1. Les sites consensus de phosphorylation des kinases Aurora ont été bien définis chez la levure à bourgeonnement, puis confirmés chez les eucaryotes, comme étant [KR]X[TS][ILV] (Cheeseman et al., 2002; Kettenbach and Gerber, 2011).



**Figure 23** : Schéma des structures des protéines kinases AurKA, AurKB et AurKC.

(D'après Tang et al, 2017)

Aurora A (AurKA) est retrouvée au niveau du matériel péricentriolaire des centrosomes pendant la phase G1/S et ses niveaux d'expression sont faibles alors qu'en phase G2 les niveaux d'ARNm et protéique augmentent fortement jusqu'à atteindre un pic en début de mitose (Kimura et al., 1997; Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998; Stenoien et al., 2003). Lors de la prophase, AurKA reste associée aux centrosomes au niveau des pôles du fuseau mitotique, et en métaphase, elle est également retrouvée au niveau du fuseau de microtubules (**Figure 24**). Aurora B (AurKB) appartient au CPC (Chromosome Passenger Complex) (Carmena et al., 2012) et est localisée aux centromères en fin de phase G2 jusqu'en métaphase (Adams et al., 2001), au niveau de la zone centrale du fuseau en anaphase et au « midbody » lors de la cytokinèse. Aurora C (AurKC), présente uniquement chez les mammifères (Bolanos-Garcia, 2005), appartient également au CPC et est localisée au niveau des centromères et de la zone centrale du fuseau mitotique. De manière général AurKA, AurKB et AurKC sont impliquées dans la condensation, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse en régulant les associations kinétochore-MTs (Hsu et al., 2000; Sasai et al., 2004; Guse et al., 2005; Norden et al., 2006; Kasuboski et al., 2011; Mathieu et al., 2013; Wilkins et al., 2014).



**Figure 24 :** Localisation de Aurora-A kinase lors de la mitose. AurKA est associée au pôle du fuseau mitotique durant toute la mitose. AurKA est en vert, les microtubules en rouge et l'ADN en bleu. Barre d'échelle : 10µm.

(D'après Barr A and Gergely F 2007)

### 2.5.2 Rôle d'AurKA en mitose

AurKA intervient à différentes étapes de la division cellulaire et est essentielle à son bon déroulement. En interphase, elle régule la stabilisation des MTs via son interaction fonctionnelle avec TPX2 et Cep192 (Bertolin et al., 2016), l'entrée en mitose via la phosphorylation de Plk1 (Macûrek et al., 2008; Scki et al., 2008) et la maturation des centrosomes (Dutertre et al., 2002; Hannak et al., 2001).

En mitose, AurKA est impliquée dans l'assemblage et le maintien du fuseau bipolaire en prométaphase (Hoar et al., 2007; Roghi et al., 1998) notamment en phosphorylant la sous-unité de la dynactine, p150<sup>Glued</sup> (Romé et al., 2010; Rebutier et al., 2013) ou en phosphorylant et interagissant avec Eg5. Elle joue également un rôle important dans l'attachement des kinétochores aux MTs et par conséquent dans le bon alignement et la bonne ségrégation des chromosomes, et ceci en phosphorylant CENP-A, un variant de l'histone H3 lors de la prophase (Kunitoku et al., 2003; Pascreau et al., 2003) ou en maintenant le SAC actif (Courtheoux et al., 2018). Elle participe aussi à la dynamique des MTs astraux et à l'assemblage du fuseau mitotique central en anaphase et est nécessaire aux étapes en début de cytokinèse (Rebutier et al., 2015).

De manière générale, en mitose, AurKA participe à la régulation de la dynamique des MTs en régulant des protéines impliquées dans l'instabilité dynamique des MTs, incluant Dda3 (Jang et al., 2011), MCAK (Zhang et al., 2008), ch-TOG (Asteriti et al., 2011; De Luca et al., 2008) et la kinésine Kif2A (Jang et al., 2009).

### 2.5.3 Régulation d'AurKA

AurKA auto-régule son activité par phosphorylation autocatalytique de sa thréonine 288 au niveau de sa boucle T activatrice (Bischoff et al., 1998; Walter et al., 2000; Littlepage et al., 2002). Son activité autocatalytique est facilitée par des cofacteurs tels que Bora, Ajuba (Hirota et al., 2003; Sabino et al., 2011; Bai et al., 2014), PAK1, HEF1 (Pugacheva and Golemis, 2005) et TPX2 (Bayliss et al., 2003; Tsai et al., 2003; Eysers and Maller, 2004; Tsai and Zheng, 2005) et est inactivée par des phosphatases PP2A et PP1 (Zeng et al., 2010). Parmi ces cofacteurs, TPX2, Bora et Ajuba sont également des substrats d'AurKA (Hirota et al., 2003; Kufer et al., 2002; Eysers and Maller, 2004; Zhu et al., 2005; Hutterer et al., 2006). Le mécanisme d'activation d'AurKA par cofacteur est le mieux décrit dans le cas de TPX2.

TPX2 (Targeting Protein for Xklp2) est une MAP qui interagit avec AurKA au niveau des pôles du fuseau et qui la recrute sur les MTs (Kufer et al., 2003). TPX2 est à la fois un substrat et un activateur d'AurKA. Plus précisément, il a été montré que TPX2 se lie au sillon hydrophobe conservé d'AurKA rendant sa conformation active (Zorba et al., 2014) Des expériences de co-cristallisation ont montré que l'interaction entre TPX2 et AurKA n'induisait pas seulement une conformation active d'AurKA mais empêchait également une déphosphorylation de sa thréonine 288 par la protéine phosphatase PP1 (Bayliss et al., 2003), mais ceci n'est pas dû à une compétition car les sites d'interaction de PP1 et TPX2 sur AurKA ne se chevauchent pas (Katayama et al., 2001).

L'activité d'AurKA est également régulée par son partenaire d'interaction BuGZ (Bub3-interacting and GLE-2 binding sequence containing ZNF207), un composant de la matrice du fuseau mitotique (Huang et al., 2018) et par la nucléophosmine/B23 (NPM), une protéine nucléaire pléiotrope impliquée notamment dans la maturation des centrosomes (Reboutier et al., 2012).

Enfin, l'expression d'AurKA est régulée par dégradation via l'ubiquitine ligase APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome), activée par Cdh1. Cette dégradation s'initie en anaphase et se termine en phase G1 (Honda et al., 2000; Taguchi et al., 2002; Lindon and Pines, 2004) expliquant son pic d'expression en mitose et étant en accord avec les fonctions qu'elle y exerce.

### 2.5.4 AurKA et cancer

Le gène *aurora-a* est localisé sur le chromosome 20q13.2, une région fréquemment amplifiée dans les cancers humains. De nombreuses études ont montré une surexpression ou une amplification d'AurKA dans de nombreux cancers, y compris le cancer du sein (Ferchichi et al., 2012; Cirak et al., 2015), de l'ovaire (Do et al., 2014), du poumon (Lo Iacono et al., 2011), le cancer gastrique (Katscha et al., 2015), colorectal (Casorzo et al., 2015), cervical (Twu et al., 2009) et le cancer de la prostate (Toughiri et al., 2013). L'expression ectopique d'AurKA conduit à l'amplification des centrosomes, à une instabilité chromosomique et à l'aneuploïdie (Zhou et al., 1998; Kufer et al., 2002; Anand et al., 2003; Giet et al., 2005), ce qui illustre les effets potentiels d'AurKA dans l'oncogénèse.

La surexpression d'AurKA a été établie comme un biomarqueur de mauvais pronostic clinique dans les carcinomes de sein. Nadler et al ont démontré, dans des TMA (tissue microarray) contenant des tumeurs de sein de 638 patientes, qu'une forte expression d'AurKA, mais non d'AurKB, était corrélée à une diminution de la survie des patientes (Nadler et al., 2008). Une forte expression d'AurKA, évaluée par immunohistochimie chez 107 patientes, a également été corrélée à un fort grade nucléaire, une faible expression de PR et un statut nodal positif (Imen et al., 2013). Dans 48 cas de tumeurs du sein triple-négatives, Yamamoto et al ont mis en évidence que le sous-type basal-like était significativement associé à de forts niveaux d'AurKA en comparaison aux tumeurs de sous-type non-basal-like (Yamamoto et al., 2009). Une étude de Schmidt M a montré que les patientes présentant une forte expression d'AurKA avaient une survie sans métastases écourtée dans le sous-type moléculaire ER+/HER2-, mais non dans les carcinomes ER-/HER2- et HER2+ (Siggelkow et al., 2012). Une analyse de 426 tumeurs primaires de sein a montré qu'une forte expression d'AurKA et de la survivine avec une amplification du gène *BTAK* corrélait avec une augmentation de l'instabilité chromosomique et une survie plus courte (Roynance et al., 2014). Toutes ces études indiquent qu'AurKA est un biomarqueur de mauvais pronostic vital dans le cancer du sein.

Les études qui ont montré une surexpression d'AurKA dans les tumeurs, ont également mis en évidence l'implication d'AurKA dans différents mécanismes de tumorigénèse, tels que la prolifération, l'EMT et les métastases. Il a été montré qu'AurKA phosphoryle



RASSF1A (Ras-associated domain family 1, isoforme A), un suppresseur de tumeur et empêche ses fonctions dans la stabilisation des MTs et dans l'arrêt de la mitose, entraînant une prolifération incontrôlée dans les cancers (Rong et al., 2007). AurKA contribue également à la survie cellulaire en augmentant les modulateurs anti-apoptotiques (Bcl-2 (Huang et al., 2008) et MCL-1 (Yang et al., 2013), et en diminuant les régulateurs pro-apoptotiques Bax (Huang et al., 2008), Bim (Moustafa-Kamal et al., 2013), PUMA (Sun et al., 2014), ou en supprimant l'autophagie via l'activité de mTOR (Zou et al., 2012).

Il a été mis en évidence qu'AurKA promeut la transition épithelio-mésenchymateuse en augmentant l'expression de SLUG (Fenouille et al., 2012) et fibrillin 1 (Sengle et al., 2012), des facteurs impliqués dans l'EMT, ou en induisant une diminution de l'expression de E-cadhérine et de  $\beta$ -caténine qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'adhésion entre cellules (Wan et al., 2008). De plus, la surexpression d'AurKA peut augmenter l'expression des métalloprotéinases, MMP-2, MMP-7 et MMP-10, engendrant une dégradation des protéines de la matrice extracellulaire, ce qui stimule la mobilité des cellules tumorales et la formation de métastases (Wang et al., 2012; Noh et al., 2015).

Le développement d'inhibiteurs d'AurKA a connu un essor important au début des années 2000 mais aucun d'entre eux n'a été au-delà de la phase III d'essais cliniques (Damodaran et al., 2017). Parmi les inhibiteurs sélectifs d'AurKA, on note le MLN8054, MLN8237 et TAS-119 (D'Assoro et al., 2016). Le MLN8054 a été le premier inhibiteur à entrer en essai clinique mais dans un but d'améliorer la fenêtre thérapeutique et de limiter ses effets toxiques, la structure chimique de la molécule a été modifiée donnant naissance à un nouvel agent, le MLN8237 (Alisertib), qui est le seul, aujourd'hui, à être évalué en phase III d'essai clinique. TAS-119 est actuellement en phase I d'essai clinique et est étudié en tant que monothérapie ou en combinaison avec des taxanes.

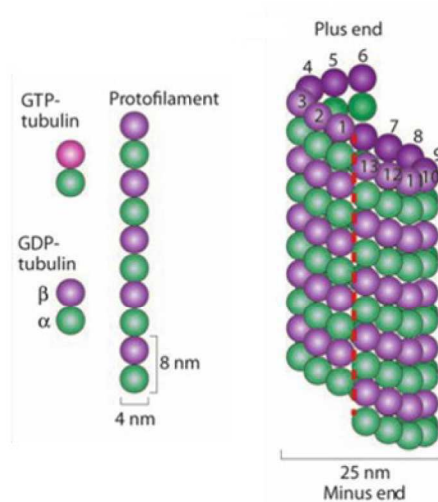
Aurora A est une importante kinase mitotique impliquée dans plusieurs processus oncogéniques, ce qui fait d'elle une parfaite cible thérapeutique dans différents cancers. Cependant certaines études chez la drosophile et chez la souris ont rapporté qu'AurKA pouvait aussi avoir des effets suppresseurs de tumeurs. Chez la drosophile, une perte d'activité d'AurKA a montré une augmentation de la taille du cerveau correspondant à une surprolifération des neuroblastes (Lee et al., 2006). Chez la souris, une hétérozygotie d'AurKA induit une augmentation significative de la formation de tumeurs (Lu et al., 2008). Il est donc nécessaire de prendre en compte que la surexpression d'AurKA peut engendrer un cancer mais que sa perte d'activité peut avoir le même effet. En d'autres termes, l'inhibition d'AurKA peut mener à la mort des cellules cancéreuses tandis qu'elle peut aussi induire la cancérogenèse à d'autres sites du corps (Damodaran et al., 2017).

### 3. Les microtubules

Les microtubules (MTs) composent, au même titre que l'actine et les filaments intermédiaires, le cytosquelette des cellules eucaryotes (Pollard and Goldman, 2018). Ce réseau de MTs est impliqué dans des fonctions cellulaires essentielles telles que le transport intracellulaire, le maintien de la forme de la cellule, le mouvement cellulaire et la division cellulaire.

#### 3.1 Structure des microtubules

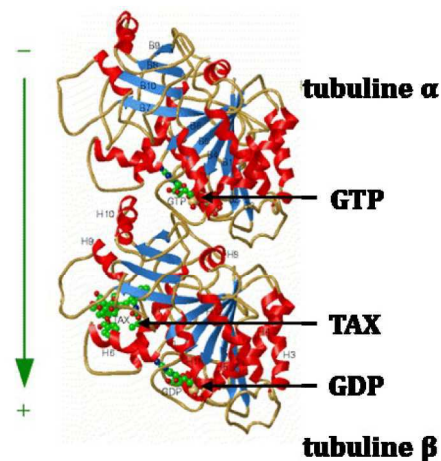
Les microtubules sont des tubes cylindriques de 25nm de diamètre et variables dans leur taille. Un filament de MT est constitué d'une suite hélicoïdale d'hétérodimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , organisés en tête à queue de façon à former un protofilament polarisé. En effet les filaments de MT possèdent une extrémité moins (-) où est exposée la sous unité  $\alpha$  et une extrémité plus (+) où est exposée la sous unité  $\beta$  (Mitchison, 1993). Les microtubules (MTs) sont composés de 13 protofilaments, parallèles entre eux et forment la maille des MTs (Amos and Klug, 1974; Brinkley, 1997; Desai and Mitchison, 1997; Valiron et al., 2001)(**Figure 25**).



**Figure 25** : Structure du microtubule.

(D'après Akhmanova and Steinmetz, 2008)

Chaque monomère de tubuline est composé de trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal possédant une région de fixation au GTP (Guanosine-5'-Triphosphate), un domaine intermédiaire contenant un site de fixation au taxane sur la sous-unité  $\beta$  et un domaine C-terminal comprenant un site de fixation des protéines motrices (Nogales et al., 1998)(**Figure 26**). Les deux sous-unités de tubuline sont structurellement similaires et possèdent chacune un site de fixation au GTP, cependant la chaîne  $\alpha$  contient un site N, non échangeable, qui fixe le GTP de façon irréversible tandis que la chaîne  $\beta$  contient un site E, échangeable, au niveau duquel le GDP (Guanosine-5'-Diphosphate) peut être échangé par du GTP, lorsque la tubuline est sous sa forme hétérodimérique. Le site E échangeable se situe à l'interface de l'inter-dimère dans les MTs et le site N est localisé à l'interface de l'intra-dimère (Spiegelman et al., 1977; Hyman et al., 1992; Valiron et al., 2001). Pendant ou après l'addition de dimères de tubuline  $\alpha\beta$  sur le protofilament, la GTP est hydrolysée en GDP sur le site E et reste sous cette forme pendant toute la croissance du MT. Après dépolymérisation du MT, le GDP fixé sur la sous-unité  $\beta$  est échangé en GTP en solution (Hyman et al., 1992).



**Figure 26 :** Structure en rubans des dimères de tubuline montrant la tubuline  $\alpha$  et sa région de fixation au GTP et la tubuline  $\beta$  contenant des domaines de fixation au taxane et au GDP. La flèche verte indique la direction du protofilament et l'axe du microtubule.

(D'après Nogales et al, 1998)

Les MTs sont des structures polarisées très dynamiques, l'extrémité (+) subit des épisodes de polymérisation et de dépolymérisation rapides et croît trois fois plus vite que l'extrémité (-) qui est globalement plus stable (Allen and Borisy, 1974; Summers and Kirschner, 1979; Mitchison and Kirschner, 1984; Jiang et al., 2014). L'équipe de McIntosh a récemment remis en question la conformation des extrémités du MT croissant. En effet jusqu'à maintenant il était montré que le bout (+) était plutôt droit et le bout (-) plutôt courbé, il semblerait finalement que les deux extrémités soient semblables et courbées (McIntosh et al., 2018; Rice, 2018).

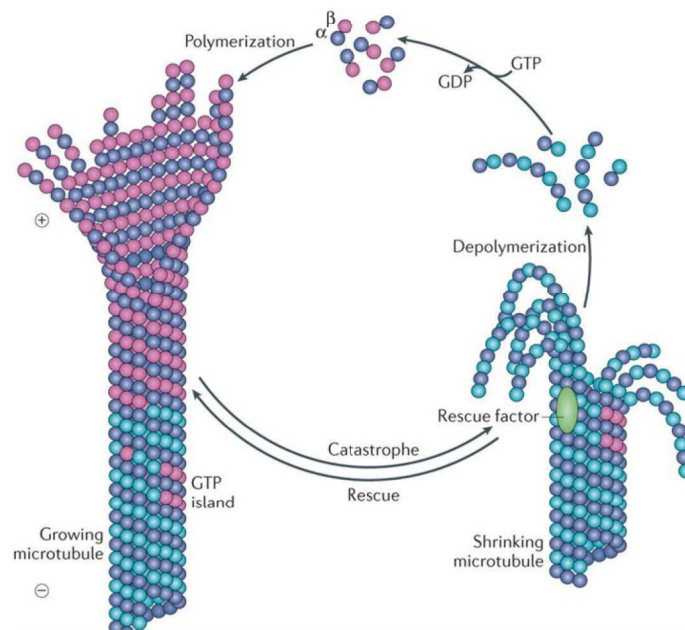
Les MTs croissent à partir du centre organisateur de microtubules (MTOC) (Microtubule Organizing Center) où les extrémités (-) sont généralement couvertes par des protéines du centrosome et leurs extrémités (+) explorent l'espace cytoplasmique et souvent interagissent avec le cortex cellulaire et agissent comme un instrument de recherche et capture (Bornens, 2008; Mimori-Kiyosue and Tsukita, 2003). La polarité des MTs est importante pour les fonctions des protéines motrices, les kinésines et les dynéines qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour le transport de divers cargos le long des MTs (Desai and Mitchison, 1997).

Les MTs peuvent se retrouver sous deux formes différentes dans la cellule, ils sont (i) soit transitoirement instables comme dans le réseau radial de cellules en interphase, dans le fuseau bipolaire lors de la mitose et la méiose, dans le réseau parallèle de cellules polarisées et dans le réseau linéaire des extensions neuronales, (ii) soit fortement stables comme dans les centrioles et dans les axonèmes de cils et de flagelles (Brinkley, 1997).

### 3.2 Dynamique des microtubules

L'étude des propriétés de la dynamique des MTs a commencé en 1972 lorsque l'équipe de Weisenberg a découvert que la tubuline pure s'assemblait et se désassemblait en présence de GTP (Weisenberg, 1972). Par la suite, l'observation d'une incorporation continue de tubuline dans la structure du MT, alors que sa taille reste constante, a fait naître la notion de « tapis de course » (treadmilling). Ce concept est défini comme un flux unidirectionnel de sous-unités de tubuline d'une extrémité du polymère à l'autre extrémité (Margolis and Wilson, 1978, 1998). Ce concept de treadmilling a été décrit dans le fuseau mitotique même si les extrémités du MT sont ancrées au niveau des pôles du fuseau et au niveau des kinétochores (Rodionov and Borisy, 1997; Waterman-Storer and Salmon, 1997; Margolis and Wilson, 1998).

Les extrémités des microtubules effectuent des cycles continus de polymérisation (croissance) et de dépolymérisation (rétrécissement) avec des périodes de pauses, un processus qui a été nommé instabilité dynamique en 1984 (Mitchison and Kirschner, 1984). La transition entre la croissance et le rétrécissement des MTs est appelée catastrophe et le sauvetage (« rescue ») définit le passage d'un rétrécissement à une croissance (Desai and Mitchison, 1997; Howard and Hyman, 2003)(**Figure 27**).



**Figure 27 :** Instabilité dynamique des microtubules.

(D'après Akhmanova and Steinmetz, 2008)

Quatre paramètres ont été proposés pour décrire l'instabilité dynamique : le taux de croissance, le taux de rétrécissement et les fréquences de catastrophe et de sauvetage. L'instabilité dynamique des MTs est menée par l'hydrolyse du GTP, attaché la tubuline  $\beta$ , qui se produit avec un retard après incorporation des dimères de tubulines à l'extrémité (+) du MT en croissance (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Suite au retard de l'hydrolyse du GTP, un cap de GTP-tubuline (GTP-cap) se forme à l'extrémité croissante du MT et protège le MT de la dépolymérisation. Une catastrophe se produit une fois que le GTP-cap disparaît et que la GDP-tubuline est exposée au bout (+) du MT (Mitchison and Kirschner, 1984).

L'instabilité dynamique joue un rôle crucial en mitose, en effet la ségrégation des chromosomes dirigés vers les pôles du fuseau lors de l'anaphase nécessite une régulation et une coordination précises de la dynamique des MTs. Toutefois, l'instabilité dynamique des MTs est importante aussi bien en mitose qu'en interphase, où elle permet une organisation spatiale des MTs, un rapide remodelage du cytosquelette et contribue à la forme de la cellule. Cette dynamique est aussi impliquée dans un processus appelé « search and capture » permettant aux MTs d'explorer le cytosol pour

capturer des cibles spécifiques, comme le cortex cellulaire ou les organelles et de guider les mouvements du MTOC.

La dynamique des MTs varie en différents endroits de la cellule en fonction du « tubulin code », un concept en pleine émergence, qui prend en compte la combinaison de l'expression des différentes isoformes des sous-unités de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  et de leurs nombreuses modifications post-traductionnelles (Barisic and Maiato, 2016; Gadadhar et al., 2017).

La dynamique de polymérisation/dépolymérisation des MTs est également étroitement contrôlée par un grand nombre de protéines associées aux microtubules (MAPs), qui font l'objet du chapitre suivant. Les MTs sont contrôlés par des facteurs qui régulent différents paramètres de leur instabilité dynamique (Lyle et al., 2009a, 2009b).

### 4. Protéines associées aux microtubules (MAPs)

#### 4.1 Protéines régulatrices du fuseau mitotique

Toutes les protéines associées aux microtubules (MAPs) sont capables d'interagir avec la tubuline ou les MTs *in vitro* ou *in vivo*. Il existe de nombreuses MAPs, les plus connues étant MAP1A et MAP1B, MAP2, Tau, MAP4, APC (Adenomatous Polyposis Coli), CLASPs et les spectraplakines MACF/ACF7 (MT-actin crosslinking factor) (Desai and Mitchison, 1997) qui sont impliquées dans différentes fonctions intracellulaires, tels que le transport de vésicules (Manning and Compton, 2008; Lyle et al., 2009a, 2009b). Ces MAPs ne feront pas l'objet de ce chapitre, seules les MAPs qui régulent le fuseau mitotique seront étudiées ici. Parmi ces MAPs, on peut distinguer les protéines non motrices (MAPs structurales ou classiques) et les MAPs motrices telles que les kinésines et la dynéine. Un groupe particulier de MAPs régule les MTs à leurs extrémités (+) et sont nommées +TIPs (plus-end tracking protéins).

##### 4.1.1 Les MAPs classiques

Parmi les MAPs classiques ou non motrices, certaines sont impliquées dans la mise en place du fuseau mitotique en stabilisant les microtubules, en modifiant leur organisation ou en permettant leur nucléation. En mitose, les MTs sont capturés au pôle du fuseau

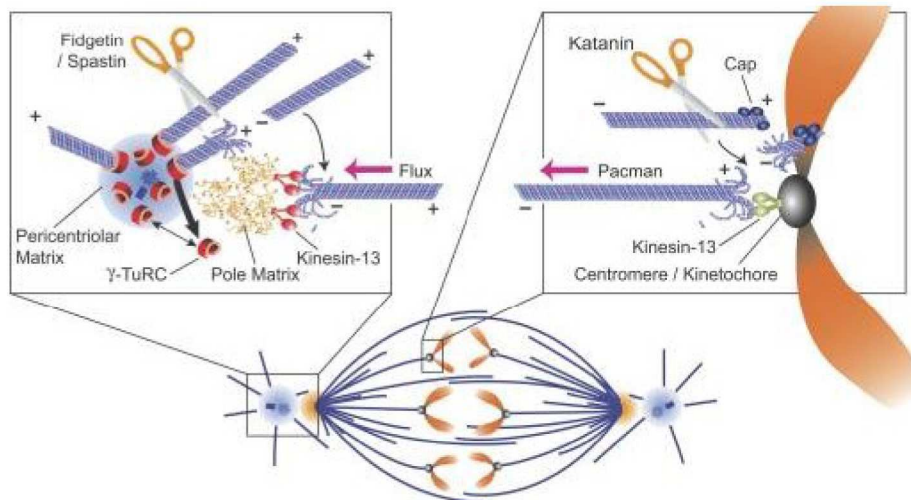
mitotique par NuMA, RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility), les protéines TACC (Transforming Acidic Coiled-coil) et TPX2. Ces protéines jouent un rôle dans l'organisation des MTs aux pôles du fuseau mitotique (Gaglio et al., 1995; Maxwell et al., 2003; Fant et al., 2004; Barros et al., 2005).

La protéine NuMA s'associe aux extrémités (-) des MTs au niveau du centrosome permettant de regrouper les MTs autour des pôles du fuseau. Sa localisation aux pôles est possible grâce à son interaction avec le complexe des protéines motrices dynéine/dynactine qui se déplace vers les extrémités (-) des MTs, c'est-à-dire les pôles (Merdes et al., 2000). TPX2 est également localisée aux bouts (-) et impliquée dans la formation des pôles mais son rôle n'est indispensable qu'en absence de NuMA (Manning and Compton, 2007). Les membres de la famille de protéines TACC interagissent avec les MTs au niveau des centrosomes et les stabilisent (Barros et al., 2005).

Dans cette famille de MAPs non motrices on retrouve également les protéines qui capturent les MTs aux kinétochores incluant CENP-E (kinésine-7) et NuSAP (Nucleolar Spindle-Associated Protein) (Yao X 2000; Putkey FR 2002, Raemaekers et al., 2003, Manning Al Compton DA 2008) qui contribuent à l'alignement des chromosomes en métaphase. On note aussi la protéine Astrin, localisée à la fois au pôle du fuseau et aux kinétochores des chromosomes alignés, où elles stabilisent les MTs et HURP (Hepatoma UpRegulated Protein) qui stabilise les MTs kinétochoriens et influence l'alignement des chromosomes (Manning and Compton, 2008).

D'autres protéines non motrices régulatrices du fuseau mitotique, à l'inverse, déstabilisent les MTs : la katanine, la spastine et la fidgetine. Ces trois protéines sont capables de couper les mailles des MTs, libérant les extrémités qui se dépolymérisent. Ces protéines contrôlent le nombre et la longueur des MTs, ce qui est nécessaire à l'assemblage et la dynamique du fuseau mitotique (McNally et al., 1996; Zhang et al., 2007). En effet, la katanine clive les MTs à côté de l'extrémité (+) et provoque une dépolymérisation des MTs attachés aux chromosomes, aidant ainsi au mouvement continu des chromosomes vers les pôles du fuseau en fin d'anaphase. En revanche, la spastine et la fidgetine coupent les MTs à l'extrémité (-) et entraînent une dépolymérisation et ce qui guide également le mouvement des chromosomes vers les pôles (Ghosh et al., 2012) (**Figure 28**).





**Figure 28 :** Implication de la katanine, spastine et fidgetine dans le mouvement des chromosomes (flux « Pacman » en anaphase).

(D'après Zhang et al, 2007)

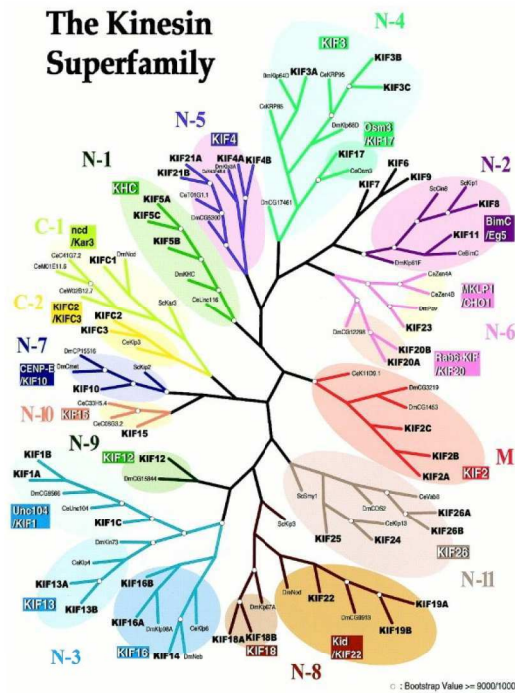
### 4.1.2 Les MAPs motrices

Chez les eucaryotes, les protéines motrices sont des partenaires essentiels des MTs en interphase et lors de la mitose et peuvent s'accumuler au bout (+) du MT en association avec d'autres +TIPs (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Les protéines motrices sont des protéines particulières qui ont la capacité d'une part de se lier aux MTs, d'autre part d'hydrolyser l'ATP et d'utiliser cette énergie pour se déplacer sur les MTs. Les familles de MAPs motrices incluent la dynéine et les kinésines, qui sont indispensables pour la mise en place du fuseau mitotique.

La dynéine est un grand complexe constitué de plusieurs sous-unités dont l'activité *in vivo* nécessite la sous-unité dynactine (Wade, 2009), qui lui confère sa spécificité et contribue au mouvement le long des MTs. La dynéine, localisée à l'extrémité (+) du MT, est impliquée dans le transport de cargos le long du MT vers les extrémités (-), dans le positionnement nucléaire et dans la formation et l'orientation du fuseau mitotique et du réseau de MTs (Wu et al., 2006). Elle joue un rôle dès le début de la prophase dans l'établissement du fuseau mitotique, puis dans la régulation de la taille du fuseau en métaphase via le transport de protéines capables de dépolymériser les MTs (Gaetz and Kapoor, 2004). Elle intervient également avec la protéine NuMA en regroupant les extrémités (-) des MTs autour des pôles (Merdes et al., 2000; Goshima et al., 2005a). La

dynéine se lie à la membrane plasmique et aux extrémités (+) des MTs astraux. Dans ce cas particulier, le mouvement de la dynéine vers les pôles permet à la fois de positionner les pôles et de contrebalancer les forces des autres protéines motrices afin de stabiliser le fuseau mitotique (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Les kinésines ont été identifiées pour la première fois en 1985 par Ron Vale et al. dans les axones géants de calamar en tant que moteurs dépendants des MTs qui génèrent une force nécessaire pour un transport rapide des organelles membranaires (Vale et al., 1985), des vésicules, des chromosomes et des complexes protéiques. Au début des années 1990, différents membres de la superfamille de protéines kinésines (KIFs) ont été clonés dans le cerveau de la souris et KIF2, une protéine motrice du transport axonal, est une des premières à avoir été caractérisée (Noda, 1995). Les kinésines localisées au pôle du fuseau mitotique et au niveau des centromères et qui régulent la dynamique des MTs lors de l'assemblage du fuseau ont, quant à elles, été clonées chez le xénope et nommées XKCM1 en 1996 (Walczak et al., 1996). Desai et al. a mis en évidence trois années plus tard que les membres de la famille des kinésines à domaine catalytique interne (Kin I), dont font parties XKCM1 et XKIF2 (de Xénopus), étaient des enzymes qui déstabilisent les MTs, les distinguant des autres kinésines qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long du MT (Desai et al., 1999). Chez l'homme, cette famille de kinésines KinI correspond aux kinésines-13. En 2001, une nomenclature des 45 KIFs identifiées dans le génome humain et murin a été proposée (Miki et al., 2001) (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Analyse phylogénique des KIFs exprimés chez l'humain, la souris, *D. melanogaster*, *C. elegans* et *S. cerevisiae*.

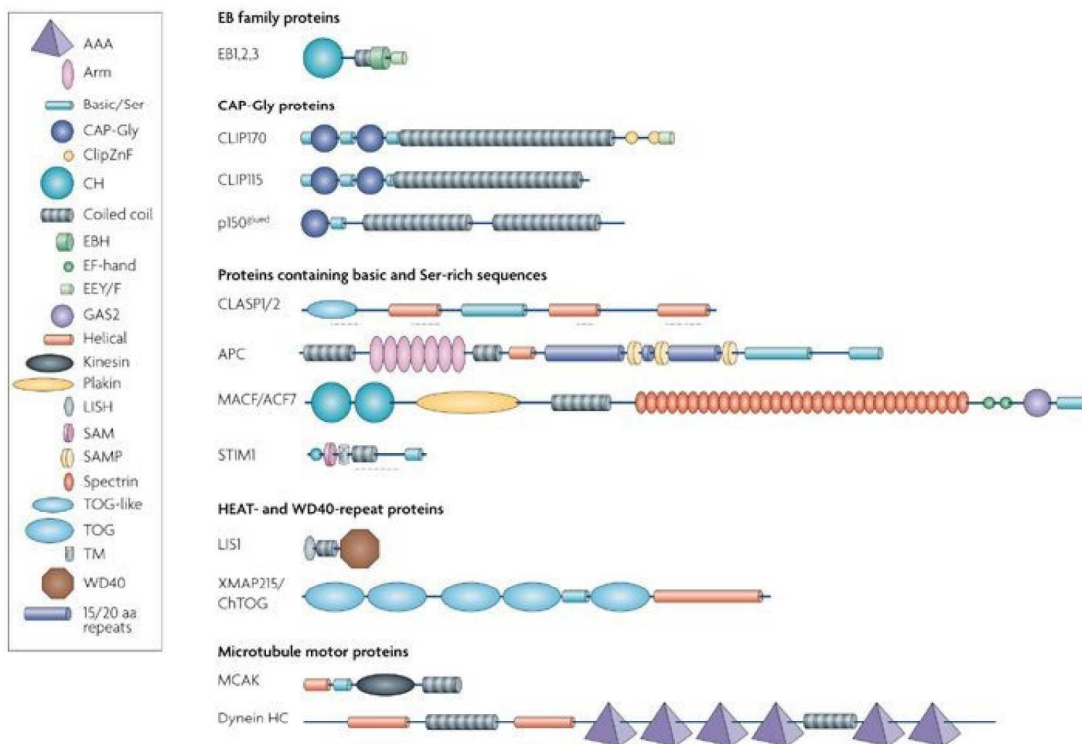
(D'après Miki et al., 2001)

Trois années plus tard, Lawrence et al. ont proposé une nomenclature standardisée pour faciliter la communication entre les chercheurs. On dénombre aujourd'hui 14 familles de kinésines (Lawrence et al., 2004). Au moins 12 d'entre elles, de différentes familles, sont impliquées dans la mitose et la cytokinèse dont Eg5 (famille kinésine-5), Kif2A (famille kinésine-13) et KifC1 (famille kinésine-14) qui ont un rôle crucial dans la formation du fuseau mitotique. KifC1, MCAK (famille kinésine-13), CENP-E (famille kinésine-7), Kif14 (famille kinésine-3), Kif18 (famille kinésine-8) et Kid (famille kinésine-10) sont essentielles pour l'alignement et la ségrégation des chromosomes. Kif4A et Kif4B (famille kinésine-4), des chromokinésines associées à la chromatine, sont importantes pour la dynamique du fuseau en anaphase et impliquées dans la cytokinèse. Enfin, MKLP1 et MKLP2 (famille kinésine-6) sont aussi des kinésines nécessaires à la cytokinèse (Zhu et al., 2005). De façon particulière, la déplétion des kinésines-13 engendre des défauts dans la dynamique des MTs, la taille, la bipolarité du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes (Maney et al., 1998; Goshima and Vale, 2003; Ganem and Compton, 2004; Kline-Smith et al., 2004; Rogers et al., 2004; Goshima et al., 2005b, 2007; Manning et al.,

2007). Ces kinésines-13, qui ont la particularité de dépolymériser les MTs, et en particulier Kif2A, seront développées au chapitre 5.1.

#### 4.1.3 +TIPs

Les +TIPs appartiennent à un groupe hétérogène de protéines qui diffèrent dans leurs structures, tailles et fonctions et qui ont la particularité de marquer l'extrémité (+) des MTs (« tracking ») (**Figure 30**). Elles incluent la famille des End-Binding protein (EBs) (qui sera détaillée dans le chapitre 4.2), les protéines CAP-Gly (Cytoskeleton-Associated Proteins Gly-rich) et les protéines SxIP (Ser-X-Ile-Pro) contenant des séquences basiques riches en sérines (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Les protéines CAP-Gly et les protéines SxIP sont des partenaires privilégiés d'EB1 (paragraphe 4.2.3).



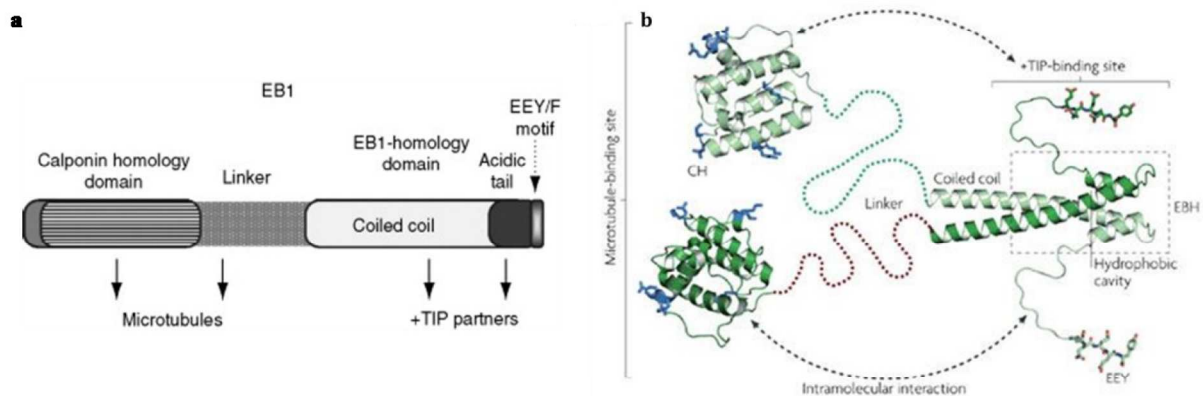
**Figure 30** : Classification des +TIPs en fonction de leur structure. Différents groupes ont été décrits selon les éléments structuraux qui sont impliqués dans leur capacité à « traquer » les MTs.

(D'après Akhmanova and Steinmetz, 2008)

## 4.2 EB1 (End-binding protein 1)

### 4.2.1 La famille des End-Binding Protein (EBs)

EB1 a été découverte en 1995 par la technique de double hybride comme étant un nouveau partenaire d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Su et al., 1995). C'est le membre représentatif de la famille des protéines End Binding (EB) qui comprend aussi EB2 (RP1) et EB3 (EBF3), codées par les gènes *MAPRE1*, *MAPRE2* et *MAPRE3* (Microtubule Associated Protein RP/EB) (Su and Qi, 2001) et seule EB1 est fortement conservée dans l'évolution. Les protéines EBs sont composées d'environ 300 acides aminés organisés en deux domaines fortement conservés connectés par une région « linker » flexible et non structurée. La partie N-terminale est un domaine homologue à la calponine (CH pour calponin homology), nécessaire et suffisant pour la liaison au MTs (Hayashi and Ikura, 2003). La partie C-terminale contient un domaine coiled-coil, impliqué dans la dimérisation (Su and Qi, 2001), qui chevauche un motif unique, le domaine EBH (End-Binding Homology) nécessaire à l'interaction avec ses partenaires et se termine par une partie acide et flexible contenant une séquence EEY/F (Akhmanova and Steinmetz, 2008) (**Figure 31**).



**Figure 31** : Schéma représentatif de la séquence protéique d'EB1 (a). Modèle de l'organisation structurale des protéines EB homodimériques. Les domaines CH (calponin homology) et EBH (EB-homology) sont représentés en rubans, les motifs EEY en bâtons et la région « linker » en lignes pointillées et courbées (b).

(D'après Montenegro Gouveia and Akhmanova, 2010 et Akhmanova and Steinmetz, 2008)

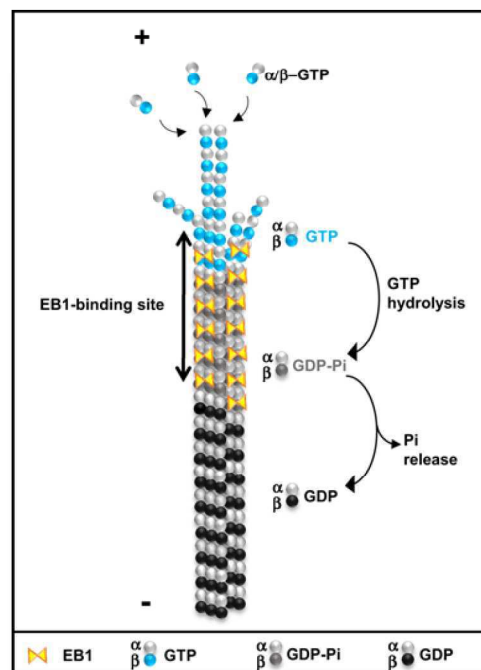
Les protéines EB1 et EB3 sont exprimées de façon ubiquitaire, EB1 étant fortement exprimée dans la plupart des tissus, alors qu'EB3 est particulièrement abondante dans le système nerveux central (Nakagawa et al., 2000). Quant à EB2, ses niveaux d'expression varient dans différents types cellulaires (Su and Qi, 2001). EB1 et EB3 sont considérées comme équivalentes dans leur capacité à « traquer » le bout plus des MTs et forment des homodimères et hétérodimères dans le cytosol (Komarova et al., 2009; De Groot et al., 2010; Sen et al., 2013). Elles sont capables d'interagir avec un grand nombre de protéines (Bu and Su, 2003).

EB2, contrairement à EB1 et EB3, se lie au bout plus des MTs avec beaucoup moins d'affinité et ne forme pas d'hétérodimère avec les deux autres membres (Komarova et al., 2009; De Groot et al., 2010; Jiang et al., 2012). Elle est également capable d'interagir avec les mêmes partenaires que EB1/EB3 (Bu and Su, 2003) mais avec une plus faible affinité, principalement dû à la présence de quelques résidus acides dans la partie finale de son domaine C-terminal. Sa partie N-terminale diffère également des protéines EB1/EB3 et contient une extension d'environ 40 acides aminés, qui est essentielle pour sa liaison aux MTs et réduit son accumulation au bout plus (Komarova et al., 2009). EB2 est la protéine EB la moins bien caractérisée.

### 4.2.2 EB1, régulateur de la dynamique des microtubules

En 1998, il a été mis en évidence qu'EB1 était associée aux MTs et était concentrée au bout plus, indépendamment d'APC (Morrison et al., 1998; Mimori-Kiyosue et al., 2000). Pendant les épisodes de croissance des MTs, EB1 (et EB3) apparaît au bout plus en formant des comètes et disparaît lors des pauses et des rétrécissements des MTs. Ces structures ont été largement exploitées pour étudier la dynamique des MTs en utilisant EB1/EB3-GFP comme des marqueurs de la croissance des MTs (Piehl and Cassimeris, 2003; Stepanova et al., 2003; Salaycik, 2005). Par la suite, des expériences de reconstitution *in vitro* utilisant des protéines purifiées ont montré qu'EB1 s'associait au MT de façon autonome sur une région étendue du bout plus (Bieling et al., 2007; Dixit et al., 2009) avec une affinité dix fois plus importante que pour le reste des mailles du MT (Maurer et al., 2011). EB1 s'échange rapidement au niveau de sa région d'interaction avec le MT *in vitro* et *in vivo* (Dragestein et al., 2008; Dixit et al., 2009). De façon importante, EB1 reconnaît une conformation transitoire dépendant de la présence de GTP/GDP-Pi au

bout plus du MT (Zanic et al., 2009) (**Figure 32**). Le domaine CH d'EB1 se lie à l'angle de 4 dimères de tubulines présents dans deux protofilaments adjacents et perçoit ainsi le changement de conformation du MT induit par l'hydrolyse du GTP (Maurer et al., 2012; Zhang et al., 2015). EB1 n'interagit pas avec le bout extrême du MT mais avec une région étendue correspondant à un état intermédiaire transitoire généré par l'hydrolyse du GTP. Il a été observé que l'interaction d'EB1 est perdue quelques secondes avant la catastrophe du MT, suggérant que le site de liaison d'EB1 protège le MT de la dépolymérisation (Maurer et al., 2012). Récemment il a été démontré que l'interaction du GTP sur son site de liaison au MT facilite le recrutement d'EB1 sur le MT *in vitro* en supprimant l'inhibition intra-moléculaire de la partie C-terminale d'EB1 (Gireesh et al., 2018).



**Figure 32** : Région d'interaction de la protéine EB1 au bout plus du microtubule.

(D'après Nehlig et al, 2017)

Des études *in vitro* ont montré qu'EB1 augmente la fréquence des catastrophes des MTs (Bieling et al., 2007; Komarova et al., 2009; Buey et al., 2012; Maurer et al., 2014) ; en effet EB1 réduit son temps de vie à son site d'interaction au bout plus, accélérant ainsi la conformation transitoire et menant à la catastrophe du MT. Cependant l'influence d'EB1 sur la dynamique du MT (*in vitro* et *in vivo*) reste controversée et dans des cellules

vivantes, EB1 est plus susceptible d'induire une croissance des MTs (Tirnauer and Bierer, 2000; Vitre et al., 2008; Komarova et al., 2009). En effet la première étude montrant qu'EB1 contrôle la dynamique en promouvant la croissance du MT *in vivo* a été réalisée avec les homologues d'EB1 chez la levure (Mal3 et Bim1) (Tirnauer and Bierer, 2000). Ceci a été confirmé chez la Drosophile chez laquelle EB1 stimule les catastrophes et les sauvetages du MT, et diminue le temps passé en pause, rendant les MTs plus dynamiques (Rogers et al., 2002). Chez le xénope, il a été démontré qu'EB1 augmente la polymérisation, les sauvetages des MTs et inhibe les catastrophes (Tirnauer et al., 2002b). Dans ce même sens, dans des cellules CHO-K1, la croissance des MTs est augmentée par inhibition des catastrophes par EB1 et EB3 (Komarova et al., 2009). A l'inverse, dans des fibroblastes de souris, EB1 accroit le temps de pause des MTs et décroît leur temps passé en croissance (Kita et al., 2006). Ces études soulignent les effets complexes de régulation de la dynamique du MT par EB1 dans un contexte cellulaire bien précis. EB1 est un régulateur crucial de l'instabilité dynamique des MTs et ses modifications post-traductionnelles affectant ses niveaux d'expression, sa stabilité et sa conformation peuvent provoquer d'importants changements dans la dynamique du bout plus du MT.

### 4.2.3 Partenaires d'EB1

En plus de réguler elle-même la maturation du MT, et malgré sa petite taille, EB1 joue un rôle crucial de plateforme de recrutement au bout plus du MT en interagissant avec de nombreuses protéines et forme ainsi un réseau de +TIPs qui contribuent à la régulation de la dynamique microtubulaire (Galjart, 2010; Jiang et al., 2012; Kumar and Wittmann, 2012).

Deux régions d'EB1 reconnaissent différents types de protéines : son domaine EBH interagit avec les protéines contenant un motif SxIP (Honnappa et al., 2009) et son motif EEY interagit avec les protéines CAP-Gly (Bieling et al., 2008). Les protéines CAP-Gly (Cytoskeleton-Associated Protein Glycine-rich) possèdent un domaine d'environ 80 résidus fortement conservés chez les eucaryotes (Riehemann and Sorg, 1993) qui peut être présent en une ou plusieurs copies et qui est impliqué dans les interactions protéines-protéines, en particulier avec les monomères et dimères de tubuline  $\alpha$ , les MTs et les protéines EBs (Steinmetz and Akhmanova, 2008). Cette famille inclut les protéines CLIPs (Cytoplasmic Linker Proteins), comme CLIP-115 et CLIP-170, et la grande sous-unité du



complexe dynactine p150<sup>glued</sup>, chez lesquelles le domaine CAP-Gly est localisé dans la partie N-terminale et interagit avec le motif EEY présent dans la région C-terminale des MTs et des protéines EBs (Honnappa et al., 2006; Ligon et al., 2006; Mishima et al., 2007). Ce domaine CAP-Gly contient une unique cavité hydrophobique qui entoure un motif GKNDG fortement conservé et des résidus Glycine (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Galjart, 2010).

Le groupe des protéines SxIP possède des séquences riches en résidus basiques et sérines, qui favorisent l'interaction avec les MTs et les protéines EBs. Dans ces régions, un petit motif conservé SxIP de 4 résidus (Ser-X-Ile-Pro) est impliqué dans l'interaction d'un grand nombre de +TIPs avec l'extrémité (+) des MTs de manière EB1 dépendante (Honnappa et al., 2009; Buey et al., 2011; Jiang et al., 2012). Toutes ces protéines SxIP partenaires d'EB1 sont structurellement hétérogènes et sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires (Jiang et al., 2012; Tamura et al., 2015). Des exemples représentatifs de ce groupe sont APC (Adenomatous Polyposis Coli), MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin), TIP150, MCAF ou ACF7, les CLASPs (CLIP-associating proteins) et Dda3, qui sera développé dans le paragraphe 5.2. Jiang K et al. ont montré que toutes les protéines SxIP ne sont pas forcément des +TIPs, c'est-à-dire que bien qu'interagissant avec EB1, elles ne traquent pas le bout plus du MT. En effet certaines d'entre elles sont des protéines associées à la membrane comme AMER2 (APC Membrane Recruitment Protein 2) et la Syntabuline (membrane de mitochondrie), d'autres sont des protéines associées à l'actine comme GAS2L1, ou des petites GTPases (RasL11B) ou encore des kinases comme MARK1, TTBK1 et TTBK2 (Tau-TuBulin Kinase 1 et 2). De façon surprenante, ces travaux ont également montré que deux protéines, Tustin et Dda3, en plus de traquer le bout croissant des MTs, étaient capables de traquer également les MTs qui se dépolymérisent (« back-tracking ») (Jiang et al., 2012).

#### 4.2.4 EB1 et MTAs

EB1 peut être affectée par les MTAs qui interagissent avec les MTs et interfèrent avec leur polymérisation et leur dynamique. Ces MTAs, déjà évoqués plus tôt (chapitre 1.5.1), ont de puissants effets anti-cancer (Jordan and Wilson, 2004; Dumontet and Jordan, 2010) et leurs effets réciproques avec EB1 ont été rapportés dans notre revue Nehlig et al. 2017 (III.2 article 2). A faible concentration les MTAs suppriment l'instabilité dynamique des

MTs et agissent comme des poisons mitotiques en figeant le fuseau, ce qui induit un arrêt en mitose suivi d'apoptose. Et à de très faibles concentrations, ces agents altèrent la différenciation et la migration cellulaire et augmentent, à l'inverse, l'instabilité dynamique (Pourroy et al., 2006; Pagano et al., 2012; O'Rourke et al., 2014). Des études récentes ont montré que des MTAs, tels que la vincristine, le paclitaxel et le patupilone régulaient la dynamique des MTs en induisant la phosphorylation d'EB1 par GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3) (Le Grand et al., 2014) et que la vinflunine interférait avec les cycles de tyrosination/détyrosination d'EB1 dans des cellules endothéliales et de glioblastome, induisant une réduction de la migration cellulaire (Rovini et al., 2013). Réciproquement, EB1 et EB3 modifient également les effets des MTAs sur la dynamique du MT. En effet, en absence des protéines EBs, les MTAs répriment les paramètres de l'instabilité dynamique, alors qu'en synergie avec les protéines EBs, ces agents induisent une fréquence plus importante des catastrophes des MTs (Mohan et al., 2013). De plus, la surexpression d'EB1 sensibilise la cellule aux effets des MTAs, comme par exemple ceux de la vinflunine sur la prolifération et la migration cellulaire (Berges et al., 2014) ou ceux de BAL27862, un MTA qui se lie à la tubuline sur le site de la colchicine, sur la migration et la différenciation des astrocytes dans le glioblastome (Berges et al., 2016). Dans le cancer du sein, les résultats restent controversés, en effet il a été décrit que EB1 soit sensibilise soit empêche les effets du paclitaxel (Luo et al., 2014; Thomas et al., 2015).

#### 4.2.5 Modifications post-traductionnelles d'EB1

Les protéines EBs sont l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent leurs interactions et leurs fonctions, comme présenté dans notre revue (**III.2 article 2**). Chez la levure, la phosphorylation des homologues d'EB1, Bim1 et Mal3, entraîne leur dissociation des MTs, et la phosphorylation de Bim1 par AurKA/Ipl1 permet une régulation de la dynamique du fuseau et du désassemblage de la « midzone » (Zimniak et al., 2009; Iimori et al., 2012). Chez l'homme, il a été montré qu'EB3 était phosphorylée par AurKA/B (Ban et al., 2009; Ferreira et al., 2013) et EB2 par AurKB et cdk1 lors de la mitose (Iimori et al., 2016). EB1, quant à elle, n'est pas un substrat des kinases Aurora, bien qu'elle interagisse avec ces kinases. Une étude phosphoprotéomique réalisée par Chen et al. a mis en évidence plusieurs sites de phosphorylation dans la séquence d'EB1 humain (Chen et al., 2014). Il a été plus récemment montré qu'EB1 pouvait être phosphorylée par ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) (Luo et al.,

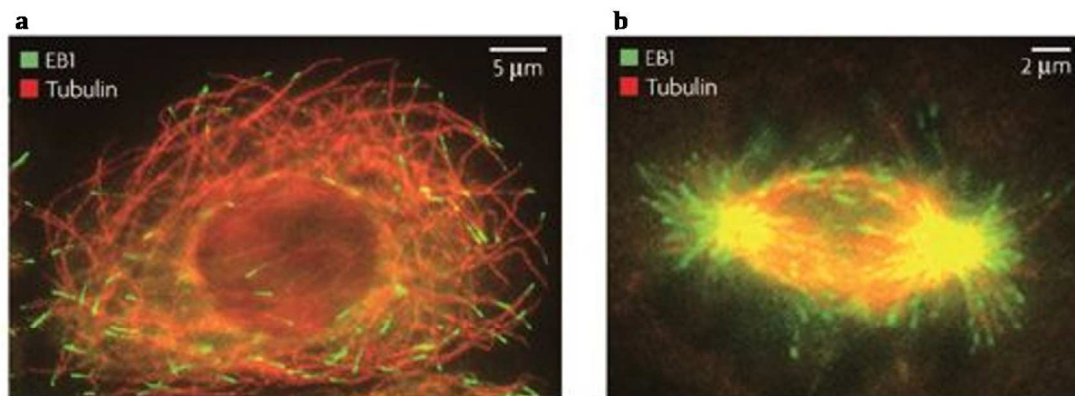
2016; Ran et al., 2017), par la kinase Src (Y. Zhang et al., 2016) et EB2 par la kinase CK2 (Stenner et al., 2013). D'autres modifications post-traductionnelles des protéines EB ont été rapportées telles que l'ubiquitination et l'acétylation. EB3 interagit avec la E3 ligase SIAH-1, est ubiquitinée puis dégradée par le protéasome, de manière dépendante d'AurKB (Ban et al., 2009). EB1 est acétylée par un facteur associé à P300/CBP (PCAF acétyltransférase) en mitose et cette acétylation peut empêcher son interaction avec plusieurs +TIPs, telles que TIP150, MCAK et Dda3 (Xia et al., 2012) et engendrer des défauts dans l'alignement des chromosomes (Ward et al., 2013). EB1 est également sujet à des cycles de détyrosination/tyrosination à l'extrémité de sa partie C-terminale. La détyrosination d'EB1 augmenterait son temps d'association à l'extrémité (+) du MT et diminuerait la fréquence des catastrophes et ainsi contribuerait à l'augmentation de la migration cellulaire (Rovini et al., 2013).

#### 4.2.6 Les fonctions d'EB1 en mitose

EB1 est localisée au bout croissant du MT en interphase mais également en mitose (**Figure 33**). En métaphase elle s'accumule à l'interface entre les kinétochores et le bout plus du MT (Tirnauer et al., 2002a; Mimori-Kiyosue and Tsukita, 2003) Green et al. ont mis en évidence qu'EB1 et son partenaire APC coopéraient lors de la mitose pour réguler la dynamique du fuseau et l'alignement des chromosomes (Green et al., 2005) De plus, EB1 est impliquée dans le positionnement du fuseau mitotique en stabilisant les microtubules astraux (Toyoshima and Nishida, 2007). Chez la drosophile, EB1 régule l'orientation du fuseau pour assurer une division cellulaire asymétrique en interagissant avec le récepteur de cytokine Domeless (Gp130) (Chen et al., 2018). EB1 joue également un rôle important dans la morphogenèse des cellules épithéliales, elle est recrutée au pôle du fuseau et aux MTs astraux par AKAP350, une protéine d'échafaudage du centrosome et du Golgi et assure une bonne orientation du fuseau (Almada et al., 2017). De plus EB1 est phosphorylée par ASK1 sur sa sérine 40, sa thréonine 154 et 206 permettant le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique et la stabilisation des MTs astraux (Luo et al., 2016). Elle est de plus impliquée dans la taille du fuseau mitotique, en effet sa déplétion engendre un rétrécissement de la distance pôle-pôle (Rogers et al., 2002; Goshima et al., 2005b).

De récentes études ont montré de façon étonnante, par la technique de CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), que des cellules stables déplétées pour la partie C-ter d'EB1 et le domaine CH d'EB3 ont des effets mineurs sur la division cellulaire et sur la polymérisation des MTs. Cependant ces mutants d'EB1 et EB3 perturbent fortement l'organisation des MTs n'émanant pas de centrosomes, dont le bout moins n'est pas attaché au centrosome mais à l'appareil de Golgi. Ces mutations affectent la migration cellulaire et l'invasion en diminuant l'attachement des MTs au Golgi (Yang et al., 2017).

EB1 est aussi retrouvée associée à d'autres structures cellulaires telles que les centrosomes, l'actine (Kodama et al., 2003), le cortex cellulaire (Mimori-Kiyosue et al., 2005), les mélanosomes (Wu et al., 2005), les cils primaires (Schröder et al., 2007) et le réticulum endoplasmique (Grigoriev et al., 2008).



**Figure 33** : Localisation d'EB1 (en vert) dans une cellule en interphase (a) et dans une cellule en mitose (b). Le marquage rouge correspond à la  $\beta$ -tubuline.

(D'après d'Akhmanova and Steinmetz, 2008)

### 4.2.7 EB1 et cancer

EB1 a été trouvée surexprimée dans des carcinomes hépatocellulaires (Fujii et al., 2005; Orimo et al., 2008), gastriques (Nishigaki et al., 2005), colorectaux (Stypula-Cyrus et al., 2014), de l'œsophage (Wang et al., 2005) et du sein (Dong et al., 2009). Notre équipe a récemment démontré qu'EB1 était un biomarqueur pronostique de la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein (voir **III.3 article 3**). Une analyse immunohistologique de 109 cas de glioblastomes humains a mis en évidence que la surexpression d'EB1 était

corrélée à un résultat défavorable sur la survie globale et la survie sans progression (Berges et al., 2014). Ce groupe a également montré que la suppression d'EB1 par shRNA inhibe la migration et la prolifération *in vitro* et que la surexpression d'EB1 promeut la croissance tumorale *in vivo*. Il a été récemment montré que la phosphorylation d'EB1 sur sa thréonine 206, catalysée par ASK1, est augmentée dans des tissus cancéreux du pancréas et qu'une déplétion d'ASK1 ou de son activité de kinase inhibe la dynamique du fuseau de MT dans ces cellules (Gao et al., 2017). Sur la base de ces travaux, EB1 pourrait être considérée comme un oncogène.

## 5. Axe Kif2A-Dda3 dans la régulation du fuseau mitotique

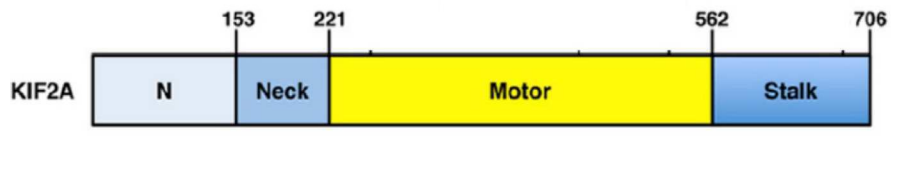
Les travaux de ma thèse ont permis d'identifier Kif2A et Dda3 comme partenaire d'interaction de notre protéine d'intérêt, ATIP3, c'est pourquoi ce chapitre est consacré à la description des protéines Kif2A et Dda3, leurs fonctions en mitose, leurs régulations et leurs implications dans le cancer du sein.

### 5.1 Kif2A

#### 5.1.1 La famille des kinésines-13

Le génome humain possède trois gènes distincts codant pour les protéines de la famille des kinésines-13 nommées Kif2A (chromosome 5q12), Kif2B (chromosome 17q22) et MCAK/Kif2C (chromosome 1p34). Ces kinésines sont non-motiles et ont une activité de dépolymérisation des MTs (Desai et al., 1999; Manning et al., 2007). Elles possèdent des séquences similaires, avec un domaine moteur et une région neck conservés au milieu de leur polypeptide, ce qui caractérise cette famille (Lawrence et al., 2004). Leurs régions N-terminale et C-terminale montrent des différences ; la partie N-terminale des kinésines-13 détermine majoritairement leur localisation à des sites cellulaires spécifiques (Welburn and Cheeseman, 2012). (**Figure 34**). Kif2A se situe essentiellement au pôle du fuseau tandis que Kif2B est localisée de façon prédominante aux centrosomes et au midbody, mais également au fuseau de MTs et de façon transitoire aux kinétochores (Manning et al., 2007; Welburn and Cheeseman, 2012). MCAK/Kif2C, localisée à la midzone, aux kinétochores et faiblement aux centrosomes, a été la première kinésine

montrant une activité de dépolymérisation *in vitro* (Wordeman and Mitchison, 1995; Walczak et al., 1996; Maney et al., 1998).

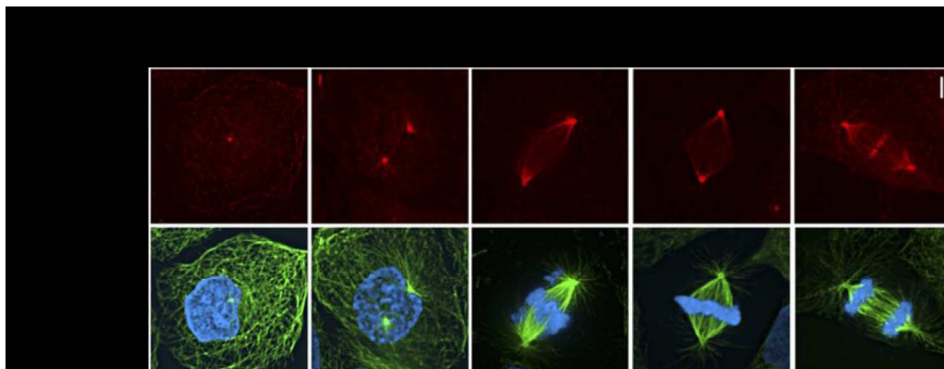


**Figure 34** : Structure schématique de Kif2A.

(D'après Miyamoto et al., 2015)

### 5.1.2 Les fonctions de Kif2A

Kif2A a été dans un premier temps connue pour ses fonctions dans le développement neuronal en supprimant les extensions des branches collatérales d'axones ( Homma et al., 2003; Hirokawa and Takemura, 2004). Kif2A est localisée aux centrosomes en interphase et au pôle du fuseau mitotique pendant tous les stades de la mitose. On la retrouve également au niveau de la « midzone » en anaphase et au pont intercellulaire en télophase (**Figure 35**) (Ganem and Compton, 2004).



**Figure 35** : Localisation de Kif2A dans les différentes phases de la mitose. Immunofluorescence réalisée dans des cellules de vertébrés utilisant un anticorps anti-Kif2A (rouge) et un anti-tubuline (vert) et le DAPI (bleu). Les cellules sont en interphase (B), prophase (C), prométaphase (D), métaphase (E) et anaphase (F).

(D'après Ganem and Compton, 2004)

Du fait de sa localisation aux pôles du fuseau mitotique lors des différentes phases de la mitose, Kif2A joue des rôles cruciaux pour le bon déroulement de la mitose, notamment

dans l'assemblage du fuseau bipolaire, la régulation de la taille du fuseau et du flux dirigé vers les pôles et dans la ségrégation des chromosomes.

Une déplétion de Kif2A induit la formation de fuseaux monopolaires indiquant qu'elle est nécessaire pour l'assemblage du fuseau mitotique bipolaire (Ganem and Compton, 2004). Kif2A dépolymérise les MTs au pôle du fuseau en association avec le flux de MT généré vers les pôles, contribuant ainsi à la régulation de la taille du fuseau en métaphase (Ganem and Compton, 2004) et au mouvement des chromosomes en anaphase (Ganem et al., 2005; Eagleson et al., 2015). Il a été également montré que Kif2A contrôle la longueur des microtubules inter-chromosomes nécessaires à l'organisation du fuseau central lors de l'anaphase. Dans les ovocytes de souris, en plus de réguler l'assemblage du fuseau et la ségrégation des chromosomes (Yi et al., 2016), Kif2A contrôle aussi l'asymétrie de la cytokinèse et la transition métaphase I-anaphase I lors de la méiose (Chen et al., 2016).

Kif2B joue un rôle essentiel pour l'assemblage du fuseau et pour le mouvement des chromosomes. Elle se distingue des deux autres membres de sa famille par sa participation dans la force générée au niveau des kinétochores, qui contribue à la vitesse et la position des chromosomes. Kif2B est également unique car elle est la seule nécessaire à la cytokinèse (Manning et al., 2007).

MCAK/Kif2C, quant à elle, est une +TIP qui comprend un motif d'interaction SxIP avec EB1 dans sa partie N-terminale. MCAK interagit aussi avec TIP150 et Kif18b, qui favorisent son interaction avec l'extrémité (+) des MTs (Moore et al., 2005; Jiang et al., 2009; Tanenbaum et al., 2011). Elle exerce son activité de dépolymérisation *in vivo* aux kinétochores (Wordeman, 2005) pour déstabiliser les MTs attachés de façon inappropriée aux kinétochores, une fonction qui est contrôlée par l'activité kinase d'AurKB (Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004; Ohi et al., 2004; Knowlton et al., 2006) et par ICIS (« inner » Centrosome Kin-I Stimulator), une MAP chez le xénope (Ohi et al., 2003), qui est l'homologue de la protéine ATIP3 (Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010). Une déplétion de MCAK a peu d'effet sur l'assemblage du fuseau bipolaire ou sur le mouvement des chromosomes, par contre, elle augmente la fréquence des chromosomes isolés (« lagging chromosomes») en anaphase (Ganem et al., 2005).

### 5.1.3 Régulation de Kif2A

La localisation et l'activité de Kif2A sont contrôlées de différentes manières pour assurer une régulation fine de ses fonctions en mitose. Par une analyse protéomique, Jang et al. ont identifié Kif2A comme étant une cible de la kinase Plk1. Plk1 interagit avec Kif2A uniquement en mitose et cette interaction est dépendante de son activité kinase. Plk1 phosphoryle directement Kif2A et augmente sa localisation aux pôles du fuseau et son activité de dépolymérisation. A l'inverse Kif2A n'a aucun effet sur la localisation de Plk1 (Jang et al., 2009). AurKA colocalise aussi avec Kif2A en mitose (Barr and Gergely, 2007) et la régule de façon négative. En effet, AurKA interagit directement avec Kif2A et la phosphoryle et, à l'inverse de Plk1, elle décroît sa localisation au pôle et son activité de dépolymérisation (Jang et al., 2009). AurKA n'est pas la seule des Aurora kinases qui régule Kif2A, en effet, chez le xénope, Aurora Kinase B phosphoryle Kif2A et inhibe son activité de dépolymérisation. Après inhibition de Kif2A par phosphorylation par AurKB, ICIS réactive Kif2A par interaction directe (Knowlton et al., 2009). Il a été montré plus précisément, dans des cellules humaines, qu'AurKB phosphoryle Kif2A sur sa thréonine T97 et limite son accumulation au bout plus des MTs du fuseau et contrôle ainsi la taille du fuseau central en anaphase (Uehara et al., 2013). Kif2A est également un substrat de TTBK2 qui la phosphoryle et l'inactive en inhibant son association aux MTs et donc son activité de dépolymérisation, de manière dépendante de EB1/3 (Watanabe et al., 2015).

Kif2A n'est pas seulement régulée par phosphorylation, sa localisation est aussi sous contrôle de plusieurs protéines régulatrices telles que la dynéine et NuMA qui sont nécessaires à son recrutement aux pôles (Gaetz and Kapoor, 2004). De façon intéressante, Kif2A est également recrutée par Dda3, une MAP, avec qui elle forme un complexe qui sera détaillé au chapitre **5.2.3**.

### 5.1.4 Kif2A et cancer

Plusieurs études ont montré que la surexpression de Kif2A est associée à un mauvais pronostic vital chez les patients atteints d'un cancer de la langue (Wang et al., 2010; K. Wang et al., 2014), d'un cancer colorectal (Fan et al., 2015), d'un cancer de l'ovaire (Wang et al., 2016; Xu et al., 2017), d'un cancer gastrique (Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2018), d'un gliome (X. Zhang et al., 2016), d'un cancer du foie (Chen et al., 2017) d'un lymphome



(Zhang et al., 2017), d'un cancer du poumon (Xie et al., 2018) et d'un cancer du sein (Wang et al., 2014).

Parmi ces études, quatre d'entre elles ont démontré un effet de la déplétion de Kif2A *in vitro* dans les cellules cancéreuses. L'extinction de Kif2A inhibe la migration et l'invasion dans des cellules de cancer de la langue (Wang et al., 2010) et de l'ovaire (Xu et al., 2017), ainsi que la prolifération dans des cellules de cancer du sein (Wang et al., 2014) et de cancer gastrique (Zhao et al., 2018) et induit, en plus de ces premiers effets, une apoptose dans les cellules de gliome (Zhang et al., 2016) et de cancer du poumon (Xie et al., 2018). Au vu de toutes ces études, Kif2A possède des propriétés oncogéniques et pourrait constituer une bonne cible thérapeutique anti-cancéreuse.

### 5.2 Dda3

#### 5.2.1 Découverte et structure de Dda3

Le gène Dda3 (Differential Display and activated by p53), localisé sur le chromosome 1p13.1, a été découvert en 1999 chez la souris par une technique de ARNm display (Lo et al., 1999). Le gène Dda3 est régulé par des dommages à l'ADN et a été montré comme étant une cible transcriptionnelle directe de p53, d'où son appellation « Differential Display and activated by p53 ». Il est constitué de 8 exons qui s'étendent sur 7.7kb et contient un motif consensus de reconnaissance à p53 localisé sur l'intron 3 (Lo et al., 1999).

Chez l'homme, le gène *DDA3* code pour une protéine de 333 acides aminés, dont 68.2% sont similaires à Dda3 murin. Dda3 est une protéine riche en sérine et proline contenant une région coiled-coil et six motifs PXXP (P pour proline et X acide aminé) correspondant à des domaines de liaison à SH3, d'où son autre nom PSRC1 (Proline/Sérine-Rich Coiled-coil protein 1). Une analyse par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) a mis en évidence que la protéine Dda3 est ubiquitaire chez l'homme et est particulièrement abondante dans le thymus fœtal et le cerveau adulte (Lo and Wang, 2002).

En 2007, Hsieh et al. ont découvert que Dda3 était une MAP qui stabilise les MTs *in vitro* et *in vivo* sous forme de « bundles » en régulant leur tyrosination (Hsieh et al., 2012). Dda3 interagit directement avec les MTs (Jang et al., 2011) et est associée au fuseau de MTs en

mitose (Hsieh et al., 2007, 2008; Jang and Fang, 2009), suggérant un rôle pour Dda3 dans la progression de la mitose.

Elle interagit de façon directe, et MT dépendant, avec EB1 et EB3 et colocalise au niveau du fuseau mitotique. Dda3 interagit avec les protéines EBs et les MTs via sa partie C-terminale et plus particulièrement avec EB1 via ses motifs SxLP/SxIP. De plus Dda3 est une +TIP dépendante de son interaction avec EB1 (Jiang et al., 2012; Zhang et al., 2013).

Enfin, l'analyse de la séquence de Dda3 a révélé la présence de multiples sites potentiels de phosphorylation, notamment par la kinase mitotique AurKA (Hsieh et al., 2002).

### 5.2.2 Les effets de Dda3 en mitose

Dda3 est associée au fuseau mitotique et aux pôles du fuseau de la prophase jusqu'à l'anaphase A, au « midbody » en anaphase B puis au pont intercellulaire lors de la cytokinèse (Jang et al., 2011). Il a aussi été montré que Dda3 était partiellement associée aux kinétochores durant la métaphase (Jang and Fang, 2011). Dda3 est ubiquitinée et dégradée de manière cycle cellulaire dépendant par l'ubiquitine ligase ASB7 (Cullin 5-interacting suppressor of cytokine signaling box 7) (Uematsu et al., 2016), expliquant ainsi les faibles niveaux d'expression de Dda3 en interphase et les forts niveaux en mitose, ce qui indique un rôle majeur de Dda3 en mitose.

De plus il a été montré que Dda3 est hyperphosphorylée en mitose (Jang et al., 2008, 2010). Une analyse de Dda3 par spectrométrie de masse a mis en évidence que plusieurs de ses sérines (sérines 22, 65, 70, 223 et 225) étaient phosphorylées en mitose, cependant ces phosphorylations n'interviennent pas dans la localisation de Dda3 (Jang et al., 2010, 2011). Dda3 est phosphorylée par les kinases mitotiques cyclinB/Cdk1, AurKA et Plk1, mais les sérines phosphorylées par ces kinases n'ont pas été identifiées à ce jour. Dda3 est phosphorylée par Cdk1 dans un premier temps et devient alors un substrat pour les kinases AurKA et Plk1. La phosphorylation de Dda3 par AurKA et Cdk1 abolit son activité de polymérisation et de formation de « bundles » de MTs mais n'affecte pas sa liaison aux MTs (Jang et al., 2011).

Dda3 est un régulateur du cycle cellulaire essentiel pour l'alignement des chromosomes en métaphase, la taille du fuseau, l'entrée en anaphase via une régulation du SAC, la

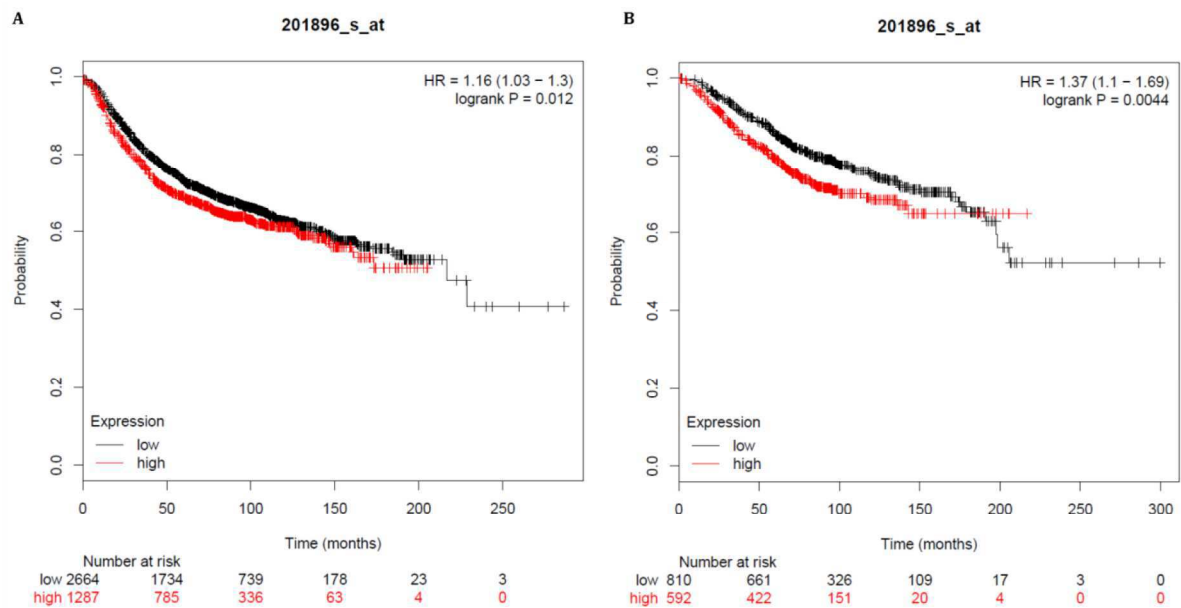
séparation des chromosomes (Jang et al., 2008), la formation des MTs astraux et le positionnement du fuseau (Song et al., 2015).

Comme décrit dans le chapitre 2.4, Dda3 recrute la kinésine Kif2A aux pôles du fuseau et assure le maintien de la taille du fuseau en régulant le flux de MTs via l'activité de dépolymérisation de Kif2A. De plus, la déplétion de Dda3 augmente l'index mitotique, le nombre de cellules en métaphase et le nombre de cellules ayant des chromosomes non alignés. Par des expériences de vidéomicroscopie Jang et al. ont montré que la déplétion de Dda3 altère et prolonge la prométaphase et les cellules ayant des chromosomes non alignés rentrent en apoptose après un arrêt en métaphase (Jang et al., 2008). Seule la phosphorylation de la sérine 225 a été montrée comme importante pour les fonctions de Dda3 sur l'alignement des chromosomes car elle restaure le phénotype engendré par une extinction de Dda3 sur les chromosomes non alignés (Jang et al., 2010, 2011). Il est à noter que dans des cellules déficientes en Dda3 les MTs sont bien attachés au kinétochores cependant la distance interkinétochores en métaphase est diminuée, indiquant que la déplétion de Dda3 abolit la tension entre les kinétochores sœurs menant à une activation du SAC. Du fait que Dda3 recrute Kif2A aux pôles, il ne serait pas impossible que Dda3 déstabilise les MTs en induisant une dépolymérisation via l'activité de Kif2A, ce qui contribuerait à maintenir une tension entre les kinétochores (Jang et al., 2008).

L'expression de la partie N-terminale de Dda3 (Dda3-N) mais non de sa partie C-terminale, mime les effets de l'extinction de Dda3 qui induit des chromosomes non alignés, un retard dans la progression de la mitose, une diminution de Kif2A au pôle et une densité plus forte des MTs dans le fuseau. Dda3-N agit donc comme un dominant négatif en inhibant le recrutement de Dda3 au fuseau, et par conséquent diminue le recrutement de Kif2A et augmente la fréquence des chromosomes non alignés en métaphase (Jang and Fang, 2009).

A ce jour, les données sur l'implication du gène *DDA3* et sur ses effets dans le cancer sont pauvres et très éparpillées et ne permettent donc pas de conclure. Le rôle de Dda3 dans le cancer du sein n'a pas encore été étudié, cependant nos analyses de courbe de survie (KmPlotter) ont indiqué que de forts niveaux de Dda3 étaient corrélés de façon significative à une survie sans rechute et une survie globale diminuées (**Figure 36**) ce qui

suggère que, comme Kif2A, Dda3 pourrait être un biomarqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein.



**Figure 36 :** Courbes de survie sans rechute (RFS) (A) et de survie globale (OS) (B) de patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction des niveaux d'expression du gène DDA3.

(D'après Kaplan Meier Plotter, kmplot.com)

### 5.2.3 Le complexe Kif2A-Dda3

Dda3 co-localise avec Kif2A aux pôles du fuseau mitotique et interagit avec de façon directe et de manière MT dépendante. Cette interaction est augmentée en phase G2 et en mitose et s'opère via la partie C-ter de Dda3 (résidues 122 à 363) et très faiblement avec sa région N-ter (Jang and Fang, 2009), par contre le domaine de Kif2A impliqué dans cette interaction n'a pas encore été déterminé.

Dda3 contrôle le recrutement de Kif2A au pôle du fuseau. En effet Jang et al. ont montré que la déplétion de Dda3 réduit la quantité de Kif2A associée au pôle du fuseau mitotique et augmente la densité des MTs (Jang et al., 2008), mais n'a aucun effet sur les niveaux d'expression de la kinésine. Sachant également que Kif2A n'a aucun effet sur la localisation de Dda3, cette dernière agit donc en amont sur le recrutement de Kif2A au pôle (Jang et al., 2008). En revanche aucune étude jusqu'à présent n'a montré comment Dda3 recrute Kif2A au pôle et l'implication de la dynéine, connue pour recruter Kif2A, n'a pas encore été abordée.

Par ailleurs Dda3 n'a aucun effet sur la localisation d'autres protéines associées au pôle comme AurKA, TPX2 et NuMA (Jang et al., 2008). Le fait que Dda3 recrute Kif2A et non NuMA, alors qu'elles sont toutes les deux recrutées par la dynéine au pôle, montre une spécificité de Kif2A pour Dda3. Dda3 n'a pas non plus d'effet sur la localisation de MCAK, mais elle interagit avec directement aux kinétochores (Jang et al., 2008). Bien que la régulation de l'activité de Kif2A par Dda3 n'ait pas été démontrée *in vitro*, il est possible que Dda3 régule les deux kinésines-13, Kif2A et MCAK, aux pôles et aux kinétochores, respectivement.

Le complexe Kif2A-Dda3 est régulé par la protéine Mdp3 (Microtubule-associated protein 7 domaine-containing 3, ou MADP7D3) avec qui Dda3 forme un complexe en mitose. Ce complexe Dda3-Mdp3 régule de façon négative la dynamique des MTs au bout moins et le flux de MT en inhibant le recrutement de Kif2A par Dda3 (Kwon et al., 2016).

Dda3 interagit également avec Ska1 (Spindle and KT associated protein) en mitose, une protéine qui déstabilise le fuseau de MTs. Dda3 cible Ska1 aux kinétochores pour stabiliser l'attachement du fuseau mitotique aux chromosomes. Ska1 régule la dynamique du fuseau en ciblant Kif2A au bout (-) du fuseau après recrutement par Dda3 (Park et al., 2016).

Kif2A et Dda3 sont toutes les deux phosphorylées par la kinase mitotique AurKA, cependant aucune étude jusqu'à maintenant n'a montré une régulation du complexe par AurKA. Kif2A et Dda3 forment un complexe important pour la régulation fine du flux de MTs et de la taille du fuseau mitotique et l'implication de notre protéine d'intérêt, ATIP3, dans ce complexe Kif2A-Dda3 et dans la régulation de la taille du fuseau fait l'objet de **l'article 4 (chapitre III.4)**.

## 6. ATIP3, une protéine anti-cancer associée aux microtubules

### 6.1 MTUS1, gène candidat suppresseur de tumeur

Le gène candidat suppresseur de tumeur *MTUS1* est localisé sur le chromosome 8 en position 8p22, une région connue pour ses fréquentes pertes d'hétérozygotie dans de

nombreux cancers. Ce gène code pour une famille de protéines (ATIP1 à ATIP4) identifiées dans le laboratoire (Nouet et al., 2004; Di Benedetto et al., 2006a).

Initialement désigné *GK1* (Kinjo et al., 2000), puis *MTSG1* (Seibold et al., 2003), *ATIP* (Nouet et al., 2004) et *MTUS1* pour Mitochondrial Tumor Suppressor 1 (Di Benedetto et al., 2006a), ce gène a été renommé « Microtubule-associated Tumor Suppressor 1 » par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) en 2010, en gardant le symbole officiel *MTUS1*.

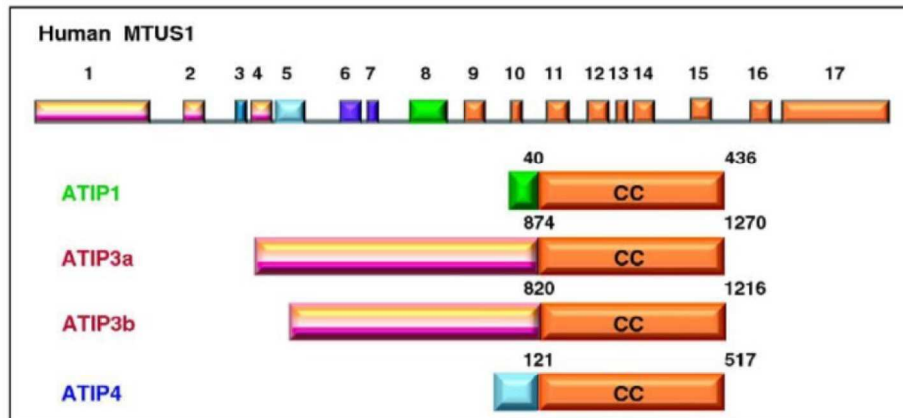
En 2000 le groupe de Nakamura a découvert le gène *GK1* par séquençage à grande échelle de l'ADN génomique dans la région chromosomique 8p21.3-p22 et a montré que ce gène code pour une protéine de 1270 acides aminés comprenant deux structures coiled-coil avec deux motifs leucine-zipper, une région N-terminale riche en acides aminés basiques et 27 sites potentiels de phosphorylation (Kinjo et al., 2000). Cette protéine correspond à la forme appelée aujourd'hui ATIP3, que les auteurs ont identifiée comme étant localisée aux mitochondries, sans lui associer de fonction.

Trois années plus tard, Seibold et al. ont rapporté l'existence d'un gène nommé *MTSG1* localisé en position 8p21.3-22 (Seibold et al., 2003). L'expression de ce gène est ubiquitaire et est fortement diminuée dans les tumeurs et lignées cellulaires tumorales de pancréas par rapport aux tissus sains, en accord avec l'hypothèse qu'il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur. Les auteurs ont cloné l'ADNc codant pour une protéine de 48 kDa qui correspond à la protéine ATIP1 et ont montré que cette protéine a des effets anti-prolifératifs et co-localise avec les mitochondries. Il est à noter que la localisation des protéines ATIP1 et ATIP3 aux mitochondries n'a pas été confirmée par des études ultérieures. Les travaux plus récents de notre équipe (Rodrigues-Ferreira et al., 2009) ont clairement établi qu'ATIP3 est associée aux MTs (voir **Chapitre 6.5**); or les mitochondries sont souvent co-localisées avec les MTs sur lesquels elles se déplacent. Les images d'immunofluorescence réalisées en 2000 et 2003 étant de faible résolution, la question de la co-localisation d'ATIP1 et ATIP3 avec les mitochondries reste ouverte aujourd'hui.

En 2004, notre équipe a identifié par la méthode du double hybride une famille de protéines (ATIP1 à ATIP4) codées par le gène *MTUS1*, alors désigné ATIP (AT2 receptor-interacting protein) et capables d'interagir avec le récepteur AT2 de l'angiotensine II

(Nouet et al., 2004). Ces travaux ont démontré que la protéine ATIP1 interagit de façon constitutive avec le récepteur AT2 et qu'elle est impliquée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire en régulant négativement les récepteurs tyrosine kinase comme le récepteur à l'insuline, à l'EGF ou au PDGF (Nouet et al., 2004).

En 2006, notre groupe a montré, par une étude approfondie du gène *MTUS1*, que celui-ci contient 17 exons codants distribués sur 112kb d'ADN génomique et est soumis à de nombreux épissages alternatifs (Di Benedetto et al., 2006a). Trois promoteurs différents (Yu et al., 2009) génèrent trois transcrits majeurs dénommés ATIP1, ATIP3 et ATIP4 dont les codons d'initiation de la traduction (ATG) sont localisés respectivement sur les exons 8, 1 et 5. De plus, l'épissage alternatif des exons 3 et 4 produit 3 transcrits différents (ATIP2, ATIP3a et ATIP3b) portant tous le même exon 1. En revanche, les exons 9 à 17 situés en 3' du gène *MTUS1* sont communs à tous les membres de la famille ATIP ; ils codent pour un domaine coiled-coil fortement conservé et impliqué dans la dimérisation des protéines ATIP, qui est maintenant considéré comme la « signature ATIP » (Di Benedetto et al., 2006a) (**Figure 37**).



**Figure 37** : Organisation structurale de *MTUS1* et des produits du gène *MTUS1* (ATIPs).

(D'après Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010)

Pour étudier l'expression tissulaire des différents variants d'épissage du gène *MTUS1*, notre équipe a conçu des couples d'oligonucléotides placés dans des exons spécifiques des formes épissées et réalisé des expériences de RT-qPCR (Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) dans un grand nombre de tissus humains (Di Benedetto et

al., 2006a). Il en ressort que le transcrit ATIP1 est ubiquitaire mais très abondant dans le système nerveux central tandis que le transcrit ATIP2, portant l'exon 3, est absent ou faiblement exprimé dans les tissus normaux - probablement dû à la présence d'un codon stop en début de séquence et une dégradation du transcrit par « nonsense-mediated decay » (Di Benedetto et al., 2006a). ATIP3a et ATIP3b, qui diffèrent par l'exon 4, sont des transcrits majeurs abondamment exprimés dans la grande majorité des tissus périphériques (y compris prostate, sein, ovaire, colon, vessie) et dans le cerveau. Ils représentent à eux deux 72% des ARNm totaux d'ATIP, ATIP3a étant souvent plus fortement exprimé qu'ATIP3b. De façon intéressante, l'ARNm d'ATIP4 est indétectable en périphérie, il est exclusivement détecté dans le système nerveux central et plus particulièrement dans le cervelet et le cerveau fœtal.

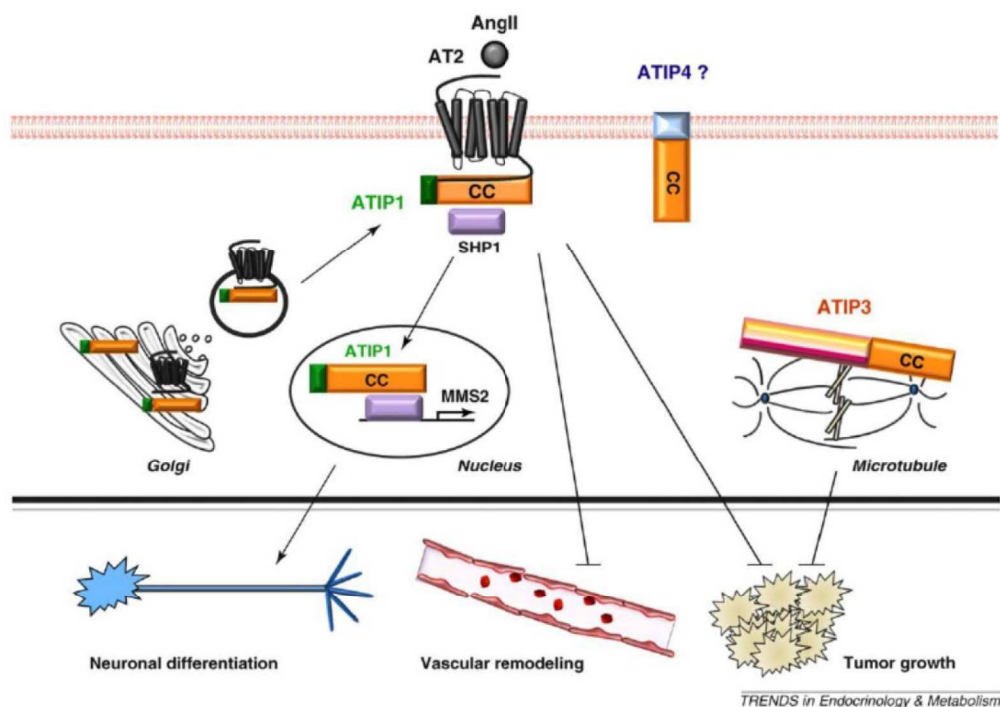
### 6.2 La famille des protéines ATIP

Du fait de l'organisation du gène *MTUS1* décrite ci-dessus, toutes les protéines ATIP partagent la même région C-terminale de 396 acides aminés. Cette région contient quatre domaines coiled-coil dont la séquence est fortement conservée chez les mammifères (86 à 96% d'identité entre l'homme, le chien, le bovin, la souris et le rat (Di Benedetto et al., 2006a). En revanche les protéines ATIP diffèrent, aussi bien en taille qu'en séquence, dans leurs portions amino-terminales qui leur confèrent des localisations intracellulaires et des fonctions différentes.

ATIP1 a été le premier membre de la famille ATIP à avoir été caractérisé, aussi bien chez l'homme (Seibold et al., 2003; Nouet et al., 2004) que chez la souris (Wruck et al., 2005). C'est le plus petit membre de la famille, avec 436 acides aminés et un poids moléculaire apparent de 50 kDa. Ses premiers 40 acides aminés, codés par l'exon 8, diffèrent des autres membres de la famille et contiennent un motif consensus de ciblage mitochondrial. ATIP1 est un partenaire privilégié du récepteur AT2 de l'angiotensine II dans les cellules eucaryotes (Nouet et al., 2004; Wruck et al., 2005; Li et al., 2007). Il interagit avec la portion intracellulaire de l'AT2 de façon constitutive, en absence de ligand et participe aux effets du récepteur dans des situations aussi variées que la prolifération cellulaire (Nouet 2004), la différenciation neuronale (Li et al., 2007), le remodelage vasculaire (Fujita et al., 2009), la senescence vasculaire (Min et al., 2012) et les fonctions des tissus adipeux (Jing et al., 2013). ATIP1 pourrait jouer un rôle de protéine d'échafaudage qui



régule l'interaction de l'AT2 avec ses effecteurs (Rodrigues-Ferreira et al. 2010). C'est le cas par exemple dans les neurones en cours de différenciation, où un complexe comprenant ATIP1, le récepteur AT2 et son effecteur SHP-1 se forme à la membrane plasmique en absence de ligand (Li et al., 2007). Suite à l'activation de l'AT2 par l'angiotensine II, ATIP1 se dissocie du récepteur mais reste associé à SHP-1 qu'il transloque dans le noyau pour réguler la transcription de MMS2 (methyl methanesulfonate sensitive 2), une ubiquitine ligase impliquée dans la différenciation neuronale. Un autre rôle important attribué à ATIP1 concerne le transport intracellulaire du récepteur AT2, de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Wruck et al., 2005). Dans les cellules murines, ATIP1 (nommé ATBP50) est localisée au Golgi et son extinction réduit l'expression du récepteur AT2 à la membrane plasmique en le retenant dans des compartiments intracellulaires. Ainsi, ATIP1 jouerait un rôle de médiateur majeur des effets du récepteur AT2 en favorisant son expression à la membrane plasmique et en coopérant avec ses voies de signalisation (**Figure 38**).



**Figure 38** : La famille des protéines ATIP est multifonctionnelle avec diverses localisations subcellulaires.

(D'après Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010)

La protéine ATIP3 a été décrite pour la première fois par notre équipe. Elle existe sous deux formes, ATIP3a et ATIP3b, qui comprennent respectivement 1270 et 1216 acides aminés. ATIP3a diffère d'ATIP3b par la présence d'une séquence de 54 acides aminés riche en prolines (PRPLP) codée par l'exon 4 et toutes deux présentent dans leur portion amino-terminale un autre motif riche en prolines (PPKP) et un signal de localisation nucléaire. A ce jour, aucune différence fonctionnelle entre ces deux protéines n'a été observée et les études mentionnant ATIP3 se réfèrent à la forme la plus longue (ATIP3a) de 1270 acides aminés. Alors qu'ATIP3 présente la « signature ATIP » qui caractérise le domaine d'interaction avec le récepteur AT2, aucune étude n'a encore exploré l'existence d'un complexe ATIP3/AT2 dans la cellule. Les travaux de notre équipe ont montré qu'ATIP3 est étroitement associée au cytosquelette de microtubules en interphase comme en mitose et présente d'importants effets suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein. Ces travaux sont détaillés dans les chapitres **6.3** et **6.4**.

Quant à ATIP4, comprenant 517 acides aminés et un poids moléculaire de 59kDa, son clonage et sa caractérisation fonctionnelle n'ont pas été entrepris à ce jour. Toutefois, deux propriétés d'ATIP4 : son expression exclusivement restreinte au cerveau (et majoritaire dans le cerveau foetal où le récepteur AT2 est particulièrement abondant), ainsi que la présence d'un domaine transmembranaire codé par l'exon 5, suggèrent qu'ATIP4 pourrait participer aux fonctions d'AT2 dans le cerveau (Di Benedetto et al., 2006a; Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010).

Il existe chez l'homme des protéines homologues à ATIP, codées par le gène paralogue *MTUS2* qui est localisé sur le chromosome 13q12 et présente une organisation génomique similaire à celle de *MTUS1* (Di Benedetto et al., 2006a). L'épissage alternatif de *MTUS2* génère deux protéines majeures, CAZIPa et CAZIPb, structurellement similaires à ATIP3 et ATIP1, respectivement (Du Puy et al., 2009). Elles sont identiques dans la région C-terminale portant un domaine coiled-coil et diffèrent dans leurs parties N-terminales, de la même façon que les protéines ATIP. De plus, la comparaison des séquences de leurs régions C-terminales indique 35% d'identité entre les domaines coiled-coil des protéines CAZIPs et ATIPs (Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010), ce qui suggère que ces protéines pourraient hétérodimériser. De façon intéressante CAZIPa, également décrite sous le nom de TIP150, est une protéine associée aux microtubules qui interagit avec EB1

aux bouts plus et régule l'association de la kinésine MCAK avec EB1 (Jiang et al., 2009). ATIP3 et TIP150 sont des protéines homologues tant du point de vue structural que fonctionnel et pourraient donc avoir des effets coordonnés sur le cytosquelette de microtubules.

L'orthologue de *MTUS1* chez le xénope code pour une protéine appelée ICIS (« inner » Centromere kin-I Stimulator) structuralement similaire à la protéine ATIP3, qui présente 1338 acides aminés et un poids moléculaire de 147 kDa (Ohi et al., 2003). ICIS contient deux domaines coiled-coil dont l'un est localisé en C-terminal et présente 60% d'identité avec la région C-terminale des ATIPs (Rodrigues-Ferreira and Nahmias, 2010). ICIS a été identifiée comme une protéine de la partie interne du centromère (« inner » centromere) localisée de façon propice à dépolymériser les MTs en stimulant l'activité de MCAK (Ohi et al., 2003). Il a été également montré que la partie N-terminale d'ICIS interagit avec AurKB et ses régulateurs INCENP et TD60 tandis que sa région centrale s'associe avec MCAK, Kif2A et les MTs. De plus, la partie C-terminale d'ICIS réverse l'effet inhibiteur d'AurKB sur Kif2A et probablement MCAK (Knowlton et al., 2009). Ainsi, ICIS pourrait jouer un rôle de protéine échafaudage qui recrute l'ensemble des activateurs et inhibiteurs des kinésines-13 aux kinétochores lors de la mitose, afin de faciliter la régulation de leur activité de dépolymérisation des MTs au niveau du fuseau mitotique et ainsi assurer une bonne ségrégation des chromosomes (Knowlton et al., 2009). Sur la base de ces résultats, il est tentant d'envisager l'hypothèse selon laquelle ATIP3, orthologue d'ICIS chez l'homme, pourrait également jouer un rôle dans la mitose via une régulation des kinésines-13.

### 6.3 *MTUS1* est altéré dans les cancers

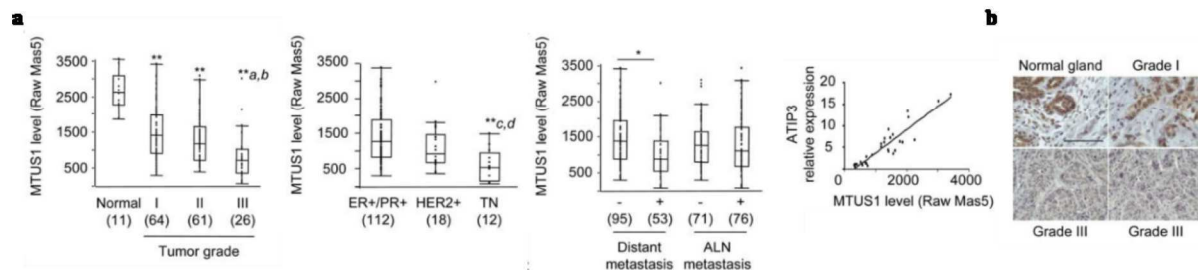
D'après le modèle original proposé par Knudson en 1971, les gènes suppresseurs de tumeurs sont fréquemment mutés sur un de leurs allèles et délétés sur l'autre et sont caractérisés par une perte d'hétérozygotie (Knudson, 1971). Afin d'évaluer la charge mutationnelle du gène *MTUS1*, notre laboratoire a entrepris de séquencer chacun des 17 exons du gène *MTUS1* dans une série de 51 hépatocarcinomes et 58 lignées cellulaires dérivées de cancer du foie par comparaison à l'ADN contrôle non tumoral. Cinq substitutions nucléotidiques ont été identifiées dans les échantillons tumoraux et sont toutes localisées sur les exons exclusifs à ATIP3 (Di Benedetto et al., 2006b). Ces

variations touchent des motifs structurellement conservés (signal de localisation nucléaire, motif polyproline, leucine zipper) et des sites d'épissage, suggérant des effets potentiellement délétères sur l'expression et/ou les fonctions d'ATIP3. Quatre de ces variations ont été également retrouvées dans une analyse réalisée dans 41 lignées de cellules squameuses de carcinomes du cou (Ye et al., 2007). De plus, une étude menée par Frank B et al. a montré qu'une déplétion de l'exon 4 du gène *MTUS1*, spécifique de la forme ATIP3a, était associée à une diminution du risque de développer un cancer du sein familial (Frank et al., 2007). Cependant, la fréquence des mutations de *MTUS1* dans ces tumeurs reste faible, suggérant d'autres mécanismes de dé-régulation de ce gène dans le cancer.

De fait, plusieurs études ont mis en évidence une forte réduction de l'expression du gène *MTUS1* dans le cancer du sein (Rodrigues-Ferreira et al., 2009), du pancréas (Seibold et al., 2003), de la vessie (Xiao et al., 2012; Rogler et al., 2014), de l'ovaire (Pils et al., 2005), de la tête et cou (Ye et al., 2007; Ding et al., 2012; Zhao et al., 2015, Mahjabin & Kayani 2016), du colon (S. Lee et al., 2006; Zuern, 2009) et dans les carcinomes gastriques (Li et al., 2014). Dans la plupart des cas, les auteurs n'ont pas cherché à discriminer les différentes formes de transcrits ATIP dérégulées dans les tissus tumoraux. Seules deux études, celle de notre laboratoire sur le cancer du sein (Rodrigues-Ferreira 2009) et celle de l'équipe de Wang sur les carcinomes de la glande salivaire (SACC) (Ding et al., 2012) ont mis en évidence par qPCR l'importance d'une sous-expression de la forme ATIP3 (plutôt qu'ATIP1 ou ATIP4) dans ces cancers et sa valeur comme biomarqueur pronostique de la survie des patients (Molina et al. 2013, Zhao et al. 2015).

Dans le cancer du sein, une étude transcriptomique de 151 tumeurs canalaire invasives a permis à notre équipe de montrer que le gène *MTUS1* était sous-exprimé dans 85% des cancers du sein de plus haut grade (grade III) et que les niveaux d'expression de *MTUS1* sont bas dans 83,3% des triple-négatifs (ER-/PR-/HER2-). De plus, un faible niveau d'expression de *MTUS1* corrèle avec les tumeurs qui développent des métastases à distance (62%) (**Figure 39a**). Les expériences de RT-qPCR utilisant des sondes spécifiques des différents variants d'ATIP ont montré qu'ATIP3, mais non ATIP1 et ATIP4, est le transcrite majeur du gène *MTUS1* exprimé dans le sein non-tumoral et qu'il est sous-exprimé dans les cancers du sein. Cette analyse a été validée par immunohistochimie montrant une expression cytosolique d'ATIP3 dans les cellules luminales de la glande

mammaire normale et une diminution, voire une perte, du marquage dans les cancers (**Figure 39b**). Une diminution des niveaux d'expression d'ATIP3 est donc associée aux cancers du sein les plus agressifs (Rodrigues-Ferreira et al., 2009).



**Figure 39** : Sous-expression d'ATIP3 dans les carcinomes de sein invasifs. (a) Comparaison des niveaux d'expression de MTUS1 dans 151 tumeurs invasives du sein et des tissus normaux classés selon le grade histologique (I, II et III) ; selon l'immunodétection des biomarqueurs ER, PR et HER2 (TN : triple-négatif) ou selon une situation de métastases à distance ou de métastases au ganglion lymphatique axillaire (ALN). (b) Immunohistochimie de sections de tumeur du sein de grade I et III et d'un tissu normal de sein adjacent à la tumeur en utilisant un anticorps anti-MTUS1.

(D'après Rodrigues-Ferreira et al, 2009)

Cette même étude a également montré que la probabilité de survie globale (OS) et de survie sans rechute (RFS pour Relapse-Free Survival) est fortement diminuée chez les patientes développant des tumeurs exprimant de faibles niveaux d'ATIP3 (Molina et al., 2013). De plus, parmi les patientes développant des métastases à distance, le pourcentage d'entre elles qui survivent après cinq ans diminue dans le cas de tumeurs ayant des niveaux d'ATIP3 faibles comparé à celles ayant des niveaux normaux d'ATIP3. Le taux de survie global chute également dans ces conditions. L'ensemble de ces études montre qu'ATIP3 est un biomarqueur pronostique de la survie des patientes et un important indicateur clinique pour les patientes développant des métastases.

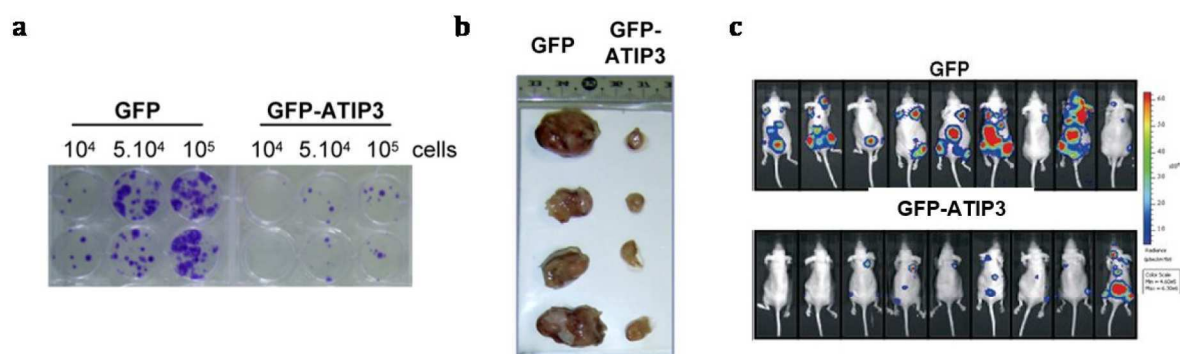
#### 6.4 Effets anti-tumoraux d'ATIP3

Au niveau fonctionnel, l'expression ectopique d'ATIP3 dans des cellules de cancer du sein ATIP3-négatives (MCF-7, MDA-MB-231) diminue la prolifération cellulaire (**Figure 40a**). A l'inverse, après déplétion d'ATIP3, les cellules MDA-MB-468 exprimant ATIP3 de façon endogène prolifèrent beaucoup plus vite que les cellules contrôles. En accord avec ces résultats, des expériences de time-lapse par vidéomicroscopie réalisées sur des cellules HeLa-H2B (dont l'ADN est marqué en rouge après transfection stable avec l'Histone H2B

fusionnée au tag mCherry) ont montré que les cellules transfectées avec GFP-ATIP3 restent plus longtemps en mitose et en particulier, prolongent l'étape de métaphase par comparaison aux cellules transfectées avec GFP seule (Rodrigues-Ferreira et al., 2009).

Des expériences *in vivo* ont de plus montré une nette diminution de la progression tumorale et de la taille des tumeurs chez des souris immunodéficientes suite à l'injection par voie sous-cutanée de cellules MCF-7 surexprimant GFP-ATIP3 par comparaison avec les cellules exprimant GFP. L'analyse histologique de ces xénogreffes a mis en évidence une diminution du nombre de cellules en division dans les tumeurs exprimant GFP-ATIP3 comparé aux tumeurs contrôles (Rodrigues-Ferreira et al., 2009) (**Figure 40b**). Pris dans leur ensemble, ces résultats soulignent les effets anti-prolifératifs et anti-tumoraux d'ATIP3.

Dans un modèle expérimental *in vivo* de métastases de cancer du sein, basé sur l'injection par voie intracardiaque de cellules métastatiques D3H2LN exprimant la luciférase, l'équipe a également montré que l'expression de GFP-ATIP3 dans les cellules tumorales diminue le nombre de souris développant des métastases et le nombre de foyers métastatiques, par comparaison aux cellules exprimant GFP (**Figure 40c**). Ainsi, ATIP3 apparaît également comme une molécule anti-métastatique (Molina et al., 2013).



**Figure 40** : Effets anti-tumoraux et anti-métastatiques d'ATIP3. (a) Formation de colonies de cellules MCF-7 transfectées avec GFP ou GFP-ATIP3. (b) Images de xénogreffes 38 jours après injection sous-cutanée de cellules MCF-7 exprimant GFP ou GFP-ATIP3 (D'après Rodrigues-Ferreira et al, 2009). (c) Image représentative des souris 24 jours après injection par voie intra-cardiaque de cellules D3H2LN exprimant GFP ou GFP-ATIP3.

(D'après Molina et al, 2013)

Ces résultats ont été confortés *in vitro* par des expériences de chimiotactisme en chambre de Boyden et de cicatrisation après blessure, montrant que l'expression d'ATIP3 réduisait la migration des cellules D3H2LN tandis que l'extinction d'ATIP3 par siRNA dans des cellules MDA-MB-468 augmentait la migration. Des expériences de vidéomicroscopie ont révélé qu'ATIP3 diminue à la fois la vitesse de déplacement des cellules et leur directionnalité (Molina et al., 2013). De façon concordante, l'équipe a également montré que l'expression d'ATIP3 s'accompagne d'une réduction marquée de la polarité cellulaire.

L'étude du groupe de Wang confortent les résultats de notre équipe. En effet ils ont montré que la réexpression d'ATIP3a dans les carcinomes de la glande salivaire (SACC) avait des effets inhibiteurs sur la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Zhao et al., 2015). Ces mêmes effets anti-cancer d'ATIP3a ont été retrouvés par le même groupe dans des cellules de carcinomes squameux de la langue (TSCC) via la voie de signalisation ERK 1/2-Snai2 (Zhao et al., 2016).

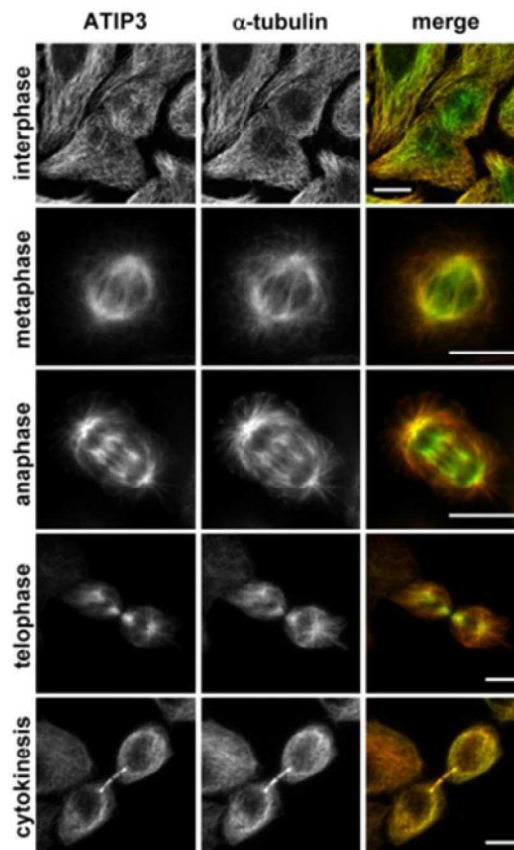
L'ensemble de ces travaux indique que l'expression d'ATIP3 réduit la prolifération, la migration et la polarité cellulaire, ce qui se traduit par une diminution de la croissance tumorale et de la formation de métastases *in vivo*, en accord avec les données cliniques de survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. ATIP3 apparait donc comme une nouvelle molécule anti-cancer et une cible thérapeutique d'intérêt pour les cancers du sein les plus agressifs.

### 6.5 ATIP3, une protéine qui stabilise les microtubules

Au niveau moléculaire, ATIP3 co-localise avec le réseau de microtubules et le centre organisateur de MTs (MTOC) en interphase et décore le fuseau mitotique pendant la métaphase et l'anaphase, ainsi que le pont intercellulaire lors de la cytokinèse (**Figure 41**). Les expériences de vidéomicroscopie, évoquées en **6.4**, ont confirmé cette colocalisation et ont montré également que GFP-ATIP3 était associée aux centrosomes dupliqués pendant la prophase. Des expériences de co-sédimentation sur des cellules exprimant GFP ou GFP-ATIP3 ont confirmé qu'ATIP3 était associée au MTs polymérisés (Rodrigues-Ferreira et al., 2009).

Notre groupe a également montré qu'une forte surexpression de GFP-ATIP3 induisait des « bundles » de MTs dans plusieurs modèles cellulaires (SKMES, HeLa, RPE-1, MDA-MB-231 et MCF-7), ce qui est une caractéristique d'une stabilisation des microtubules. De plus,

l'équipe a montré que les cellules HeLa déplétées pour ATIP3 sont plus sensibles au nocodazole que les cellules contrôles ; à l'inverse l'expression de GFP-ATIP3 augmente le nombre de cellules résistantes à la dépolymérisation des MTs par traitement au nocodazole. Ces expériences indiquent qu'ATIP3 stabilise les microtubules.



**Figure 41** : ATIP3 est associée aux microtubules en interphase et en mitose. Barre d'échelle : 10µm.

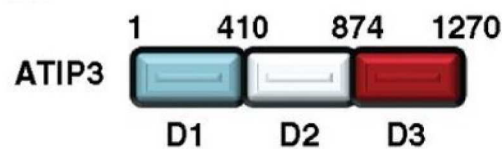
(D'après Rodrigues-Ferreira et al, 2009)

Pour étudier les effets d'ATIP3 sur la dynamique des microtubules, l'équipe a analysé l'accumulation de la protéine EB1, le marqueur de la dynamique, aux bouts plus des microtubules. Il s'avère que l'expression d'ATIP3 diminue le nombre et la taille des comètes EB1, alors qu'un siRNA ATIP3 les augmente. Des expériences de vidéomicroscopie réalisées en TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) ont permis d'analyser la vitesse de déplacement de la protéine fluorescente EB1-GFP et ainsi de montrer que la déplétion d'ATIP3 agit sur tous les paramètres de l'instabilité dynamique :



elle augmente la croissance des MTs et diminue le temps passé en pause et la fréquence des catastrophes. Toutes ces données indiquent qu'ATIP3 est une MAP qui diminue la dynamique des MTs au bout plus en les stabilisant (Molina et al., 2013).

Pour déterminer le domaine fonctionnel de la protéine ATIP3, celle-ci a été divisée en trois parties de tailles égales dénommées D1, D2 et D3 (**Figure 42**). La région D1 comprend plusieurs résidus acides et est chargée négativement, tandis que D2 contient plusieurs motifs polyproline et des résidus basiques et est chargée positivement. D3 contient 4 grands domaines coiled-coil formés de leucine zipper et termine par une courte région C-terminale riche en proline, arginine et serine/threonine. Chacun des domaines a été fusionné à la GFP pour étudier sa localisation et ses effets intracellulaires. Il s'avère que le domaine D1 ne s'associe pas aux MTs et est plutôt diffus dans le cytosol tandis que le domaine D2 co-localise clairement avec le cytosquelette de MTs et les centrosomes. L'expression de GFP-D3 engendre la formation d'agrégats contenant la tubuline, probablement dû à l'oligomérisation de ses motifs coiled-coil, ce qui gêne l'étude de la localisation et des propriétés fonctionnelles de D3.



**Figure 42** : Schéma représentatif des domaines d'ATIP3. Les numéros des acides aminés correspondent au numéro d'accèsion NP\_001001924.

(D'après Molina et al, 2013)

Au niveau fonctionnel, l'expression de GFP-D1 n'a pas d'effet significatif sur le nombre, la taille et l'intensité des comètes EB1. A l'inverse, GFP-D2, comme GFP-ATIP3, se retrouve associée aux MTs dans des expériences de co-sédimentation et son expression empêche l'accumulation d'EB1 au bout plus des MTs, indiquant que le domaine D2 est suffisant pour stabiliser les MTs (Molina et al., 2013). En accord avec ces résultats, l'expression de GFP-D2 réduit de 92% la prolifération cellulaire en comparaison au contrôle GFP et des expériences de cicatrization ont montré que GFP-D2 réduisait la migration cellulaire et la

directionnalité. Ainsi, le domaine D2 récapitule les effets fonctionnels d'ATIP3 sur la directionnalité, la migration et la prolifération cellulaire et représente le domaine actif de la molécule (Molina et al., 2013).



# II. Objectifs et questions posées

## II. Objectifs et questions posées

A mon arrivée au laboratoire, les travaux de mon équipe d'accueil avaient montré qu'ATIP3 constituait un biomarqueur pronostique de la survie des patientes et une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt dans les cancers du sein les plus agressifs de sous-type triple-négatif. D'un point de vue moléculaire, l'équipe a montré qu'ATIP3 était une nouvelle MAP, localisée le long des microtubules dans des cellules en interphase et associée au fuseau mitotique durant la mitose. ATIP3 stabilise les microtubules et diminue leur dynamique de polymérisation/dépolymérisation aux bouts plus, entraînant par là-même une réduction de la prolifération, la motilité et la polarité cellulaires, en accord avec ses effets anti-tumoraux et anti-métastatiques. Cependant les mécanismes d'action d'ATIP3 restaient encore méconnus.

Mon projet de thèse se situe dans la continuité directe de cette étude. L'objectif principal de ce projet vise à identifier des partenaires d'interaction d'ATIP3 dans le but de mieux définir les mécanismes d'action anti-tumorale d'ATIP3.

Pour cela je me suis attachée à (i) caractériser les complexes moléculaires entre ATIP3 et ses partenaires, à (ii) déterminer les mécanismes de régulation de ces complexes et enfin à (iii) explorer la valeur pronostique de ces interactions dans les tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein.

La recherche de nouveaux partenaires d'interaction que j'ai entreprise au cours de ma thèse a été abordée en deux volets. Le premier, basé sur des données de séquences de la protéine ATIP3 montrant l'existence d'un motif consensus SxIP d'interaction à la protéine EB1, concerne l'étude ciblée de cette protéine comme partenaire fonctionnel d'ATIP3 (**article 1, article 2 de revue et article 3**). Le second volet de l'étude a consisté à élargir cette étude, pour rechercher sans à priori de nouveaux partenaires d'interaction d'ATIP3 par une approche de protéomique utilisant la spectrométrie de masse. Cette seconde approche m'a permis d'identifier de nombreux partenaires d'ATIP3, parmi lesquels la kinésine Kif2A a fait l'objet d'une étude plus approfondie en particulier dans le contexte de la régulation du fuseau mitotique par ATIP3 (**article 4**).

# III. Résultats



## III. Résultats

### 1. ARTICLE 1:

#### **Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3**

Velot L, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, Nehlig A, Bouchet BP, Morel M, Leconte L, Serre L, Arnal I, Braguer D, Savina A, Honoré S, Nahmias C

Oncotarget, 2015



Les travaux antérieurs de l'équipe (Molina et al., 2013) avaient démontré qu'ATIP3 est une MAP capable de réguler la dynamique des MTs pour contrôler la polarité et la migration cellulaire. L'objectif de cette étude était de chercher à savoir comment ATIP3 régule de façon négative les paramètres de l'instabilité dynamique des MTs.

L'analyse de la séquence en acides aminés d'ATIP3 a révélé un motif canonique SxIP (SAIP) dans son domaine D3 en C-terminal et deux motifs similaires à une séquence SxIP (KNIP et RPLP) dans sa région centrale D2, tous entourés par des régions riches en résidus basiques et sérines. Les motifs SxIP sont connus comme étant des motifs d'interaction à la protéine EB1 et comme un signal de localisation qui leur confère la capacité de traquer le bout (+) des MTs. La présence de ces trois motifs nous a conduits à poser l'hypothèse qu'ATIP3 pourrait être un nouveau partenaire d'interaction d'EB1.

De façon intéressante, des expériences de GST-pull down réalisées sur des lysats de cellules MCF-7 de cancer du sein, transfectées de façon transitoire avec GFP-ATIP3, ont montré que GFP-ATIP3 était capable d'interagir avec GST-EB1. Des expériences similaires de GST-pull down utilisant des cellules HeLa exprimant ATIP3 de façon endogène ont confirmé ce premier résultat. L'interaction d'ATIP3 avec la protéine EB1 et son homologue EB3 a ensuite été validée par co-immunoprécipitation.

Pour caractériser cette interaction entre ATIP3 et EB1, des lysats cellulaires exprimant GFP-ATIP3 ont été incubés en présence de protéine recombinante comprenant la partie N-terminale ou C-terminale d'EB1 fusionnée à la GST. Comme la plupart des partenaires d'EB1 comprenant un motif SxIP, ATIP3 interagit avec la région C-terminale d'EB1. Le domaine d'ATIP3 impliqué dans cette interaction a été ensuite investigué par des expériences de GST-pull down en transfectant les constructions GFP-D1, GFP-D2 et GFP-D3 dans les cellules MCF-7. De façon surprenante, seul le domaine D2 d'ATIP3 était capable d'interagir avec EB1 et plus précisément avec le domaine C-terminal d'EB1, éliminant le motif SAIP présent dans la région D3 d'ATIP3, prédit dans un premier temps pour interagir avec EB1. Pour déterminer quel motif SxIP (KNIP ou RPLP) de la région D2 interagit avec EB1, des délétants de la séquence D2 ont été construits et taggués avec la GFP. Les résultats de GST-pull down ont montré que seul le domaine D2C pouvait interagir avec EB1 et ont permis d'identifier une séquence de 112 acides aminés, nommée CN,

portant le motif d'interaction avec EB1. La délétion de ce domaine CN dans la protéine entière  $\Delta$ TIP3 ( $\Delta$ TIP3 $\Delta$ CN) et dans le domaine D2 (D2 $\Delta$ CN) induit une diminution significative de l'interaction avec EB1. De plus, la délétion du motif RPLP dans le domaine CN (CN67 $\Delta$ P) réduit également l'interaction avec EB1. Des peptides fluorescents correspondant à une séquence minimale de 45 acides aminés nommée CN45 comprenant le motif RPLP, ou à une séquence contrôle CC n'interagissant pas avec EB1, ont été incubés avec la protéine recombinante GST-EB1. Les résultats ont démontré que CN45 interagit de façon directe avec EB1. L'ensemble de ces résultats indiquent qu'ATIP3 interagit directement avec EB1 via une séquence homologue à SxIP, le motif RPLP, localisé dans la partie CN.

La région D2, qui possède la séquence de liaison à EB1, avait été précédemment impliquée dans l'association de la protéine ATIP3 avec les MTs. Pour déterminer si l'interaction ATIP3-EB1 nécessite le domaine de liaison avec le MT, différents délétants du domaine D2 ont été transfectés dans des cellules RPE-1 afin de révéler leur localisation intracellulaire. De façon intéressante, le domaine CN67 d'interaction à EB1 reste complètement diffus dans le cytosol. Il est à noter que le mutant D2 $\Delta$ CN décore toujours les mailles du réseau de MT, alors que l'interaction avec EB1 est perdue. Ces résultats indiquent que l'interaction avec EB1 et l'interaction avec le MT impliquent deux régions différentes localisées dans la partie centrale et fonctionnelle d'ATIP3.

Comme mentionné plus haut, la présence d'un motif SxIP confère souvent à la protéine qui le porte la capacité de traquer l'extrémité (+) des MTs. Une expression transitoire de niveaux faibles de GFP-ATIP3 dans des cellules RPE-1 suivie d'un marquage de la protéine EB1 a été réalisée. Les images d'immunofluorescence ont montré qu'ATIP3 décore les mailles du MT mais ne s'associe pas avec EB1 au bout (+). L'analyse d'images de time-lapse de cellules co-transfectées avec mCherry-ATIP3 et EB3-GFP ont confirmé qu'ATIP3 était localisée le long du MT mais ne s'accumulait pas au bout croissant des MTs et par conséquent qu'ATIP3 n'était pas une +TIP (plus-end tracking protein). De façon surprenante, des expériences de vidéomicroscopie avec des cellules MCF-7 exprimant de façon stable GFP-ATIP3 ont mis en évidence que, plutôt que s'accumuler au bout (+) du MT, ATIP3 s'accumule à l'extrémité du MT qui se rétrécit, lui conférant un comportement de « back-tracking », ce qui conforte l'idée qu'ATIP3 est fortement associée aux MTs puisqu'elle continue à se lier aux MTs alors qu'ils se dépolymérisent.

Comme ATIP3 n'interagit pas avec EB1 au bout croissant du MT, des expériences de PLA (Proximity Ligation Assay) ont été entreprises pour identifier le compartiment cellulaire dans lequel l'interaction se produit. Cette expérience a été réalisée dans des cellules HeLa avec des anticorps anti-MTUS1 (ATIP3) et anti-EB1 pour révéler l'interaction des protéines endogènes, mais aussi dans des cellules RPE-1 exprimant de façon transitoire GFP-ATIP3 et ses délétants fusionnés à la GFP, en utilisant des anticorps anti-GFP et anti-EB1. Les signaux d'amplification de PLA ont été observés dans les conditions endogènes aussi bien que dans les cellules transfectées avec ATIP3, D2, D2C et CN. En revanche, l'expression des délétants ATIP3 $\Delta$ CN et D2 $\Delta$ CN a montré une forte réduction des signaux d'amplification de PLA. L'analyse détaillée des images de PLA a montré que l'interaction avec EB1 se produisait majoritairement dans le cytosol, ce qui est cohérent avec le fait que le domaine d'interaction avec EB1, CN67, est cytosolique. Il est intéressant de noter également que certains signaux de PLA ont été détectés le long des mailles du MT avec les constructions GFP-ATIP3 et GFPD2, ainsi qu'ATIP3 endogène. L'ensemble de ces résultats indiquent qu'ATIP3 interagit avec EB1 *in situ* via son domaine CN principalement dans le cytosol et le long des mailles du MT.

Les travaux précédents de l'équipe ont montré que la déplétion d'ATIP3 augmentait la dynamique du MT et que la réexpression d'ATIP3 et D2 limitait l'accumulation d'EB1 au bout croissant du MT. Pour déterminer la conséquence de l'interaction ATIP3-EB1 sur la localisation d'EB1 à l'extrémité (+) du MT, les délétants de D2 ont été transfectés dans des cellules RPE-1 et des marquages ont été réalisés avec des anticorps anti-GFP, anti-tubuline et anti-EB1. L'observation des images de fluorescence a révélé que les domaines d'interaction avec EB1 (D2C, CN et CN67), empêchent l'accumulation d'EB1 au bout (+), tandis que les domaines qui ne se lient pas à EB1 (CC, D2 $\Delta$ CN et CN67 $\Delta$ P) n'ont aucun effet sur le nombre et la longueur des comètes EB1. Cette délocalisation d'EB1 du bout (+) vers les mailles du MT et vers le cytosol dans les cellules transfectées avec D2, D2C et CN est cohérente avec les résultats de PLA. Ces résultats indiquent une implication fonctionnelle du domaine d'interaction d'ATIP3 dans la réduction de l'accumulation d'EB1 au bout (+). Des expériences de sauvetage (« rescue ») ont été réalisées dans des cellules HeLa déplétées pour ATIP3 et dans lesquelles GFP-ATIP3 et ses délétants ont été réintroduits à des niveaux endogènes, suivies d'un marquage d'EB1. Les résultats ont montré que GFP-ATIP3, comme les domaines d'interaction GFP-D2 et GFP-CN, restaurent le phénotype engendré par la déplétion d'ATIP3 sur les comètes EB1, ce qui n'est pas le cas de GFP-

D2ΔCN, incapable d'interagir avec EB1. Ces résultats démontrent que l'interaction ATIP3-EB1 est essentielle pour les effets d'ATIP3 sur la formation des comètes EB1.

Les effets d'ATIP3 sur la localisation des partenaires d'EB1, tels que CLIP-170 et la kinésine MCAK, ont été étudiés. Le nombre de comètes GFP-CLIP-170 et GFP-MCAK qui colocalisent avec EB1 est augmenté dans des cellules déplétées en ATIP3, ce qui suggère qu'ATIP3 ne diminue pas seulement l'accumulation d'EB1 mais celle des complexes EB1/+TIPs au bout plus des MTs. Il est à noter qu'un mutant de MCAK, incapable d'interagir avec EB1, reste cytosolique en présence d'ATIP3 confirmant que la régulation des comètes MCAK par ATIP3 nécessite EB1.

La capacité des MTs à atteindre le cortex cellulaire est compromise en présence d'ATIP3, ce qui porte défaut à la polarité cellulaire. Nous avons montré que, comme pour ATIP3, le domaine D2 empêche les cellules de se polariser tandis que le mutant D2ΔCN, incapable d'interagir avec EB1, restaure une cellule polarisée, montrant l'importance de l'interaction ATIP3-EB1 dans les fonctions d'ATIP3 sur la polarité cellulaire.

Pour préciser les mécanismes par lesquels ATIP3 régule de façon négative EB1, nous avons étudié les conséquences de la déplétion d'ATIP3 sur la dynamique d'association d'EB1 à son site de liaison sur le bout croissant des MTs. Par des expériences de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) réalisées dans des cellules HeLa déplétées ou non pour ATIP3 et exprimant EB1-GFP, nous avons montré que la réapparition de la fluorescence d'EB1-GFP au bout plus des MTs après photo-blanchiment était plus rapide dans les cellules déficientes pour ATIP3, mais n'était pas modifiée dans le cytosol. Ce résultat indique que la vitesse d'échange d'EB1 à son site de liaison est augmentée en absence d'ATIP3. ATIP3 interagit donc avec EB1 dans le cytosol pour limiter sa dynamique d'échange entre le cytosol et son site de liaison au bout plus des MTs. Des études de vidéomicroscopie par TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy), réalisées *in vitro* en présence de la protéine EB1-GFP et du peptide CN45 purifiés, ont montré que CN45 n'a pas d'effet sur l'intensité des comètes EB1, indiquant que l'interaction *in vitro* ATIP3-EB1 n'est pas suffisante pour réguler la localisation d'EB1 au bout plus. Ces résultats suggèrent que la régulation négative d'EB1 par ATIP3 nécessite la présence d'autres composants cellulaires ou implique des modifications post-traductionnelles.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un nouveau mécanisme par lequel l'interaction  $\Delta$ TIP3-EB1, ayant lieu dans le cytosol, réduit de façon indirecte la cinétique d'échange d'EB1 à son site de liaison au MT, induisant ainsi une régulation négative de la dynamique du MT au bout (+). Ce mécanisme de régulation négative d'EB1 a été discuté plus en détails dans la revue (voir **REVUE** chapitre **III.2**).

## **Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3**

Lauriane VELOT<sup>#1,2,3</sup>, Angie MOLINA<sup>#1,2,3</sup>, Sylvie RODRIGUES-FERREIRA<sup>1,2,3</sup>, Anne NEHLIG<sup>1</sup>, Benjamin Pierre BOUCHET<sup>4</sup>, Marina MOREL<sup>3</sup>, Ludovic LECONTE<sup>5</sup>, Laurence SERRE<sup>6</sup>, Isabelle ARNAL<sup>6</sup>, Diane BRAGUER<sup>7,8</sup>, Ariel SAVINA<sup>9</sup>, Stéphane HONORE<sup>7,8</sup>, Clara NAHMIAS<sup>\*1,2,3</sup>

# equal contribution

1. Inserm U981, Institut Gustave Roussy Department of Molecular Medicine, F-94805, Villejuif, France.
2. Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, F-94270, Le Kremlin-Bicêtre, France.
3. CNRS UMR8104, Institut Cochin, 75014 Paris France.
4. Cell Biology, Faculty of Science, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands.
5. Cell and Tissue Imaging Core Facility, PICT-IBiSA, CNRS UMR144 Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France .
6. Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.
7. Aix Marseille Université, Inserm, CRO2 UMR\_S 911, 13385 Marseille, France.
8. APHM, Hôpital Timone, 13385 Marseille, France.
9. Scientific Partnerships Roche SAS, Boulogne Billancourt, France.

\* **Contact information** : Dr Clara Nahmias, Inserm U981, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif. Email : [clara.nahmias@inserm.fr](mailto:clara.nahmias@inserm.fr)  
Tel : (+33) 682 00 69 33

**Keywords** : EB1 / MTUS1 / protein interaction / +TIP / microtubule dynamics

**Included** : 5 Figures, 6 Supplementary Figures, 3 Supplementary Tables, 4 movies

## ABSTRACT

The regulation of microtubule dynamics is critical to ensure essential cell functions. End binding protein 1 (EB1) is a master regulator of microtubule dynamics that autonomously binds an extended GTP/GDP-Pi structure at growing microtubule ends and recruits regulatory proteins at this location. However, negative regulation of EB1 association with growing microtubule ends remains poorly understood. We show here that microtubule-associated tumor suppressor ATIP3 interacts with EB1 through direct binding of a non-canonical proline-rich motif. Results indicate that ATIP3 does not localize at growing microtubule ends and that *in situ* ATIP3-EB1 molecular complexes are mostly detected in the cytosol. We present evidence that a minimal EB1-interacting sequence of ATIP3 is both necessary and sufficient to prevent EB1 accumulation at growing microtubule ends in living cells and that EB1-interaction is involved in reducing cell polarity. By fluorescence recovery of EB1-GFP after photobleaching, we show that ATIP3 silencing accelerates EB1 turnover at microtubule ends with no modification of EB1 diffusion in the cytosol. We propose a novel mechanism by which ATIP3-EB1 interaction indirectly reduces the kinetics of EB1 exchange on its recognition site, thereby accounting for negative regulation of microtubule dynamic instability. Our findings provide a unique example of decreased EB1 turnover at growing microtubule ends by cytosolic interaction with a tumor suppressor.

## INTRODUCTION

Microtubules (MTs) are polarized structures that continuously switch between periods of polymerization and depolymerization at their growing (plus) ends. This process, termed MT dynamic instability, allows rapid reorganization of the MT cytoskeleton during essential cell functions such as cell polarity and migration, mitosis and intracellular transport of proteins and organelles. Alterations in MT dynamic instability parameters lead to defects in MT targeting, mitotic spindle formation and chromosome segregation, with subsequent consequences on cancer initiation and progression.

MT dynamic instability is tightly regulated by microtubule-associated proteins (MAPs) and plus-end tracking proteins (+TIPs) that accumulate at growing MT plus ends [1,2]. End-Binding protein EB1 is a +TIP that plays a pivotal role in orchestrating protein interaction networks at growing MT ends. EB1 binds MTs with its N-terminal calponin homology (CH) domain and displays in its C-terminal portion an EB homology (EBH) domain responsible for interaction with a wide variety of regulatory +TIPs. EB1-recruited proteins contain either a cytoskeleton-associated protein glycine-rich domain (CAP-Gly) or a consensus sequence SxIP (serine - any aminoacid - isoleucine - proline) embedded in an intrinsically unstructured polypeptide region rich in basic, proline and serine residues [2-6]. In addition to its role as a molecular platform for regulatory +TIPs, EB1 has an intrinsic regulatory effect on MT dynamics at growing ends. EB1 senses the nucleotide state of MTs and is able to bind autonomously an extended GTP/GDP-Pi cap structure at the MT end [7-9] with more than 10-fold higher affinity compared to the microtubule lattice [8]. Measurements of EB1 protein dynamics showed that they exchange very rapidly at growing MT ends with fast binding/unbinding kinetics [10-12]. In mammalian cells [13] and *Xenopus* extracts [10], EB1 has been shown to increase persistent MT growth and suppress catastrophe frequency. Recent *in vitro* studies have identified EB1 as a MT maturation factor that decreases the maturation time of growing MT ends [14], providing a mechanistic link between EB1 localization and regulation of MT dynamics. However, negative regulation of EB1 association with MT growing ends, which is essential to EB1 function, remains poorly understood.

ATIP3 is a novel MAP encoded by candidate tumor suppressor gene *MTUS1* whose expression is markedly down-regulated in a variety of human cancers [15-17]. ATIP3 re-expression at normal levels into breast cancer cells significantly reduces cell proliferation, tumor growth and metastatic dissemination in animal models [15,17] underlying important



tumor suppressor effects. ATIP3 also limits cell migration by decreasing cell polarity and directionality, and impairs the ability of MTs to reach the cell cortex as a consequence of reduced MT dynamics at the plus ends [17]. Conversely, ATIP3 depletion increases MT dynamic instability by increasing MT growth and growth rate, and decreasing catastrophe frequency and time spent in attenuated state [17]. Interestingly, the effects of ATIP3 deficiency on MT dynamic instability parameters are superimposable to those observed upon EB1 expression in living cells, leading us to investigate whether ATIP3 may negatively regulate EB1 functions at growing MT ends.

In the present study, we show that ATIP3 interacts with EB1 in an MT-independent manner. The interaction involves a non-canonical sequence that directly binds EB1 *in vitro*. ATIP3-EB1 complexes are present in the cytosol and impair EB1 accumulation at growing MT ends. FRAP analyses indicate that ATIP3 deficiency increases the dynamic exchange of EB1 at growing ends with no modification of EB1 diffusion in the cytosol. Our results support a novel model for negative regulation of EB1 turnover at MT plus ends.

## RESULTS AND DISCUSSION

### ATIP3 interacts with EB1

To investigate whether ATIP3 interacts with EB1, we used anti-mCherry (mCh) antibodies to isolate mCh-ATIP3 complexes from MCF7 cells expressing mCh-ATIP3 fusion protein and EB1 fused to green fluorescent protein (EB1-GFP). Western blotting with anti-GFP antibodies confirmed the presence of a mCh-ATIP3-EB1-GFP complex (Fig.1A, upper panel). In a reciprocal experiment, mCh-ATIP3 was detected by anti-mCh antibodies following immunoprecipitation of EB1-GFP (Fig.1A, middle panel) as well as GFP-EB3 and EB3-GFP (Supplementary Fig.S1A), indicating that ATIP3 is able to bind EB1 and EB3 in intact cells. Of note, ATIP3-EB1 complexes were not detectable by co-immunoprecipitation of endogenous proteins expressed in HeLa cells, suggesting that the interactions between these proteins are weak or transient and/or involve a fraction of the proteins.

GST pull-down assays were performed using GST-EB1 as an affinity matrix. As shown in Fig.1B, GST-EB1, but not GST, precipitated GFP-ATIP3 fusion proteins as well as endogenous ATIP3 expressed in HeLa cells (Fig.1C). Full-length ATIP3 was then cleaved into three regions designated D1, D2 and D3 (Fig.1D) that were fused to GFP. Pull-down experiments using GST-EB1 (Fig.1E) revealed that only the central (D2) region is retained on GST-EB1 beads. Of note, the C-terminal D3 region does not interact with EB1 although it contains a bona fide SxIP motif embedded in an intrinsically unstructured polypeptide region rich in basic, proline and serine residues (Supplementary Fig.S1B), which is a hallmark of EB1 binding [3,5,18]. Accordingly, deleting the last 30 residues of ATIP3 (DelCTer mutant) did not abrogate EB1 binding (Supplementary Fig.S1C). Furthermore, EB1 binding was not affected by replacement of core hydrophobic residues of the consensus SAIP motif with polar residues (Ile and Pro at positions 1251-1252 of the ATIP3 sequence changed to Asn and Ala, respectively) in SANP and SAIA mutants (Supplementary Fig.S1C), further indicating that the canonical SxIP motif of ATIP3 is not essential to EB1 interaction.

To map the domain of EB1 that interacts with ATIP3, we used GST-EB1 deletion mutants comprising either the N-terminal (EB1-N) or C-terminal (EB1-C) portion of the molecule [20]. As shown in Fig.1F (left panel), both ATIP3 and D2 interact with the C-terminal region of EB1, as do other EB1 partners [1-6]. Of note, D2 still binds GST-EB1-ΔAc (Supplementary Fig.S1D), an EB1 deletion mutant that lacks the last 19 amino

acids and does not interact with SxIP-containing proteins [5,19], suggesting that the mode of interaction between EB1 and ATIP3 differs from that of EB1-SxIP partners.

To evaluate whether MTs may contribute to ATIP3-EB1 binding, cells were treated with nocodazole at a concentration that totally depolymerizes cellular MTs. In these conditions, ATIP3 and D2 still bound EB1 (Fig.1F, right panel), indicating that EB1-ATIP3 interaction does not require an intact MT network.

To map further the EB1-interacting region of ATIP3, a series of deletion mutants (Fig.1D) were analyzed in GST-EB1 pull-down experiments. As shown in Fig.1G (upper panel) D2C and CN fragments retained the ability to interact with EB1. Deletion of the CN sequence in ATIP3 and D2 polypeptides (ATIP3delCN and D2delCN mutants) led to a marked decrease in EB1 interaction (Fig.1H) whereas deleting the adjacent CC sequence (delCC1, delCC2, D2delCC1 mutants) did not abrogate EB1 binding (Supplementary Fig.S1E). The EB1-interacting region was further refined to sequences of 67 and 45 amino acids (CN67 and CN45, respectively) (Fig.1G, lower panel). The minimal EB1-interacting sequence CN45 is evolutionary conserved (Supplementary Fig.S1F) and includes a proline-rich motif whose deletion (Del3P mutant) markedly reduced EB1 binding (Fig.1H).

To investigate whether the interaction is direct, a fluorescent peptide corresponding to the CN45 sequence was synthesized and analyzed in GST-EB1 pull-down assays *in vitro*. The CC sequence, that does not bind EB1, was used as a negative control. As shown in Fig.1I, FITC-CN45 (but not FITC-CC) was specifically retained on GST-EB1 beads, indicating direct interaction between CN45 and EB1 and suggesting that ATIP3 might bind EB1 directly. Altogether, these results demonstrate that ATIP3 interacts with EB1 *via* a non-canonical motif present in the C-terminal part of the D2 sequence.

### **EB1-interaction and MT-binding involve different ATIP3 regions**

To evaluate whether EB1-interaction and MT-binding may involve the same region of ATIP3, we analyzed the cellular localization of GFP-fused D2 deletion mutants by immunofluorescence. As shown in Fig.2, both N-terminal (D2N) and C-terminal (D2C) portions of D2 co-localized with tubulin along the MT lattice. Shorter deletion mutants of D2C (CN and CC) remained mostly cytosolic, suggesting that MT localization involves a conformational recognition motif that requires both parts of the sequence. Importantly, the EB1-interacting domain CN was diffuse in the cytosol whereas the D2delCN deletion mutant, that has lost EB1 binding, still decorated the MT lattice

(Fig.2, Supplementary Table S1), indicating that EB1-interaction is independent of MT-binding and that the two interacting regions are not overlapping.

### **ATIP3-EB1 complexes are present in the cytosol**

The interaction between ATIP3 and EB1 prompted us to examine whether EB1 may recruit ATIP3 at growing MT plus ends. We used RPE-1 cells that have a sparse MT array and are well suited for visualizing individual MTs and MT ends [17]. Cells were transfected with levels of GFP-ATIP3 close to endogenous, to avoid MT bundling due to ATIP3 overexpression [17]. As shown in Fig.3A, EB1 comet-like structures were still detectable in low GFP-ATIP3-expressing cells and GFP-ATIP3 was distributed along the MT lattice but did not co-localize at MT ends together with endogenous EB1. Time-lapse analysis (Supplementary Fig.S2A, Movies 1 and 2) also clearly showed distinct patterns of mCh-ATIP3 and EB3-GFP localization in living cells and indicated that ATIP3 does not accumulate at growing MT ends. Finally, time-lapse images of MCF7 cells stably expressing moderate levels of GFP-ATIP3 (Supplementary Fig.S2B, Supplementary Movie 3) confirmed that ATIP3 decorates the MT lattice and has no tip-tracking properties. Interestingly, they also revealed for the first time that ATIP3 accumulates at the end of shrinking microtubules in living cells, highlighting its back-tracking behavior.

To reveal the location of ATIP3-EB1 complexes inside the cells, we used the Proximity Ligation Assay (PLA) duolink technology that allows *in situ* detection of molecular complexes in single cells at the location where the proteins of interest interact [21]. Molecular proximity between endogenous ATIP3 and EB1 proteins was assessed in HeLa cells using anti-MTUS1 and anti-EB1 primary antibodies followed by *in situ* detection of fluorescent Rolling Circle amplification Products (RCP). Individual bright fluorescent RCP signals were detected in control cells but not following transfection with ATIP3- or EB1-siRNA (Fig.3B). Red RCP signals indicating molecular proximity between endogenous ATIP3 and EB1 proteins were distributed throughout the cytosol (Fig.3B) and were found to some extent to colocalize with the MT lattice (Fig.3B, inset). PLA amplification signals were also detected using anti-GFP and anti-EB1 primary antibodies in RPE-1 cells expressing GFP-ATIP3 and GFP-D2, but not GFP-D1 (Fig.3C) nor in negative control conditions (Supplementary Fig.S3A, S3B and S3C). Specific PLA signals were also revealed in mCh-ATIP3-transfected RPE-1 cells stably expressing EB1-GFP using anti-mCh and anti-GFP primary antibodies (Supplementary

Fig.S3D). In line with GST-EB1 pull-down assays, PLA analyses revealed the presence of *in situ* molecular complexes between endogenous EB1 and GFP-D2C and GFP-CN, but not GFP-D2N and GFP-CC regions (Supplementary Fig.S3E). The number of *in situ* PLA amplification signals was markedly reduced in cells transfected with ATIP3delCN and D2delCN deletion mutants as compared to full-length ATIP3 and D2 region (Fig.3D), further demonstrating the involvement of the CN sequence in EB1-ATIP3 complex formation in intact cells.

### **ATIP3 interacts with EB1 to limit its accumulation at growing ends**

To investigate the consequence of ATIP3-EB1 interaction on the accumulation of EB1 as comet-like structures at growing MT ends, which is a hallmark of MT dynamics, we analyzed EB1 staining in the presence of D2 and deletion mutants. As shown in Fig.4A, expression of EB1-interacting regions D2C and CN reduced the number and length of EB1 comets to the same extent as D2, whereas CC - that does not bind EB1 - had no significant effect on EB1 comet-like structures. Of importance, deletion mutants (D2delCN and Del3P) having lost the ability to interact with EB1 were no longer able to reduce EB1 accumulation at growing MT ends (Fig.4A, Supplementary Table S1), highlighting functional relevance of ATIP3-EB1-interaction.

To validate our results, rescue experiments were performed on ATIP3-silenced HeLa cells in which GFP-ATIP3 was re-introduced at levels close to endogenous (Supplementary Fig.S4A). As expected, EB1 comets in ATIP3-depleted cells were significantly increased as compared to control, and moderate levels of GFP-ATIP3 were sufficient to fully rescue the ATIP3 knock-down phenotype (Supplementary Fig.S4B). Importantly, moderate expression of GFP-D2 and GFP-CN, but not GFP-D2delCN, in ATIP3-silenced HeLa cells was sufficient to restore EB1 comets (Supplementary Fig.S4C, S4D and S4E) further confirming that ATIP3/EB1-interaction is essential to the regulatory effects of ATIP3 on EB1 comets formation.

We then investigated the consequence of ATIP3 silencing on the localization of EB1 partners such as CLIP-170 and the MCAK kinesin, that bind EB1 via a CAP-Gly and a SxIP motif, respectively [1,2]. As shown in Supplementary Fig.S5A and S5B, the number of GFP-CLIP-170 and GFP-MCAK comets that co-localized with EB1 was increased in ATIP3-depleted cells, indicating that ATIP3 reduces the accumulation of EB1/+TIPs molecular complexes at growing MT ends. Of note, a MCAK-3E mutant that does not interact with EB1 [3] remained cytosolic in both control and ATIP3-silenced cells

(Supplementary Fig.S5C), confirming that regulation of MCAK comets by ATIP3 requires EB1. Thus, by interacting with EB1, ATIP3 negatively regulates the association of EB1 molecular complexes at MT growing ends. This, in turn, may contribute to fine-regulation of MT dynamics in the presence of ATIP3.

As a consequence of decreased MT dynamics, the ability of MT tips to reach the cell cortex was markedly impaired during cell migration, leading to defects in cell polarity in migrating D2-positive cells compared to control cells (Fig.4B). Deletion of the EB1-interacting domain (D2delCN mutant) restored a radial array of MTs at the cell margin and abrogated the effect of D2 on cell polarity, further illustrating the importance of EB1 interaction in ATIP3 function. Of interest, expression of the EB1-binding region CN partially impaired MT organization and cell polarity (Fig.4B) but was not sufficient to fully recapitulate the effects of ATIP3 suggesting that other ATIP3 regions, possibly involved in MT binding, might also contribute to ATIP3 biological function.

#### **ATIP3 silencing increases EB1-GFP exchange on MT ends**

To get more insight into the mechanism by which ATIP3 negatively regulates EB1, we examined the consequence of ATIP3 depletion on the dynamic association of EB1 with MT plus ends. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments were performed on HeLa cells expressing EB1-GFP following transfection with either control or ATIP3-specific siRNA. Bleaching was done in the distal part of growing MT ends and recovery of EB1-GFP fluorescence was measured (Fig.5A, Supplementary Movie 4). After correction for cytoplasmic background and fluorescence decay,  $K$  recovery for the exchange of EB1-GFP on MT ends in control cells was  $3.47 \pm 0.45 \text{ s}^{-1}$  (half-life of association  $0.24 \pm 0.03 \text{ s}$ ), which is very close to values previously reported for EB3-GFP recovery on MT ends in COS-7 cells ( $K$  recovery of  $3.37 \text{ s}^{-1}$ , half-life of association  $0.20 \text{ s}$ ) [12]. As shown in Fig.5A and 5B, EB1-GFP fluorescence recovery at MT plus ends was significantly faster in ATIP3-silenced cells ( $K$  recovery of  $5.23 \pm 0.66 \text{ s}^{-1}$ , half-time of association  $0.17 \pm 0.02 \text{ s}$ ), with no significant modification of EB1-GFP fluorescence decay (Supplementary Fig.S6A), indicating that EB1 exchange on its recognition site at growing MTs is increased in the absence of ATIP3. Of note, the lifetime of EB1-GFP labeled region on MT plus ends (EB1 decoration time, that specifies EB1-interacting sites at MT ends) remained unchanged in ATIP3-deficient versus control cells ( $2.68 \pm 0.93 \text{ s}$  ( $n=100$ ) and  $2.67 \pm 1.28 \text{ s}$  ( $n=70$ ), respectively) (Supplementary Fig.S6B), indicating that ATIP3 silencing does not alter EB1-recognition sites on MT ends.

To investigate whether ATIP3 may impair EB1 free diffusion in the cytosol, which is rate limiting for EB1 exchange at MT plus end [11, 12], EB1-GFP fluorescence recovery after photobleaching was measured in the cytosol of HeLa cells following ATIP3-silencing. As shown in Supplementary Fig.S6C and S6D, ATIP3 depletion does not significantly modify EB1-GFP fluorescence recovery in the cytosol (K recovery of  $2.2 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$  in control cells versus K recovery of  $2.1 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$  in ATIP3 silenced HeLa cells), ruling out a major effect of ATIP3 on EB1 mobility. Altogether, these results indicate that ATIP3 binds EB1 in the cytosol to indirectly slower its binding/unbinding kinetics on MT plus ends, without affecting free diffusion of EB1.

*In vitro* studies were conducted to further explore the consequence of ATIP3-EB1 interaction in a cell-free system. Using dual-color time-lapse total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy, we analyzed fluorescence intensity of purified EB1-GFP in the presence of dynamic ATTO-565 labeled microtubules and increasing amounts of CN45 peptide, that directly binds EB1 *in vitro*. As shown in Fig.5C, CN45 even in high molar excess had no significant effect on EB1 comets intensity, indicating that ATIP3-EB1 interaction *in vitro* is not sufficient to regulate EB1 localization at growing MT ends. Accordingly, MT dynamic instability parameters measured *in vitro* were not modified in the presence of EB1-interacting peptide CN45 (Fig.5C, Supplementary Table S2). Together, these studies suggest that negative regulation of EB1 at the MT plus ends by ATIP3 may require the presence of additional cellular components or involve post-translational modifications.

### **A novel model for negative regulation of EB1 at growing MT ends**

Our data support a model in which cytosolic ATIP3-EB1 complexes slower the dynamic association of EB1 on growing MT ends, without affecting EB1 free diffusion and with no major alteration of its recognition site. In ATIP3-silenced cells, EB1 turnover is faster and EB1 is more prone to accumulate at plus ends together with its interacting partners, therefore leading to increased MT dynamic instability and subsequent increase in cell polarity.

Recent studies conducted in developing neurons have shown that MAP1B and tau, two stabilizing MAPs that decorate MTs, also interact with EB1/3 and negatively regulate their accumulation at growing MT ends [22,23]. A sequestration model has been proposed in which EB1 is retained in the cytosol by interaction with MAP1B [22] or immobilized by elevated levels of tau proteins [23]. Of note, quantitative proteomics

studies performed in NIH-3T3 [24], UO2S [25] and HeLa [26] human cell lines have revealed high EB1 protein copy number ( $4 \cdot 10^5$  to  $1 \cdot 10^6$  molecules per cell) compared to ATIP3 (from undetectable to 300 or 1000 times less abundant than EB1), making it unlikely that ATIP3 sequesters EB1 in the cytosol. Arguing against a sequestration mechanism, FRAP analyses of EB1-GFP recovery indicate that ATIP3 silencing does not modify free mobility of EB1 in the cytosol. Our *in vitro* studies, showing that the purified CN45 peptide has no significant effect on EB1 comets intensity, further rule out the possibility that direct ATIP3-EB1 interaction may be responsible for decreased EB1 comets at MT ends. Together, our findings favor a novel mechanism by which ATIP3 interacts with EB1 in the cytosol and indirectly slows its turnover on growing MT ends, thereby leading to decreased MT dynamics and cell polarity.

Given the potent tumor suppressor effects of ATIP3, these findings may have clinical relevance in the field of cancer. Indeed, EB1 overexpression has been reported in hepatocellular carcinoma [27], breast cancer [28], colorectal carcinoma [29,30] and glioblastoma [31] and is associated with tumor progression and reduced survival of the patients [27,31]. Decreasing EB1 association with its binding site at MT ends, with subsequent decrease in MT dynamics and cell polarity, may thus represent an interesting therapeutic option. Among the wide variety of EB1 partners, only few have been recognized as tumor suppressors [5]. The major tumor suppressor Adenomatous Polyposis Coli (APC) is a well-known EB1 interacting protein that paradoxically cooperates – rather than competes - with EB1 during mitosis and cell migration [32-34]. The Cylindromatosis CYLD tumor suppressor is another EB1-interacting +TIP that also acts in concert with EB1 to regulate MT dynamics and cell migration [35]. Results presented here provide the first evidence for negative regulation of EB1 dynamic association at MT ends by cytosolic interaction with a tumor suppressor protein. This study extends our knowledge of EB1 regulation at growing MT ends and may have important implications in the field of cancer, in particular for aggressive tumors showing ATIP3 deficiency.



## **Methods**

### **Cell lines**

Human breast cancer cell lines MCF7, HC7 (MCF7 cells stably expressing endogenous levels of GFP-ATIP3) and D3H2LN, as well as SV-MRC5 lung fibroblasts, HeLa and RPE-1 cells were described previously [15, 17]. MCF7, SV-MRC5-SV and RPE-1 cells express undetectable levels of ATIP3, whereas HeLa cells express endogenous ATIP3 [15, 17]. Cells were routinely authenticated by morphologic observation and tested for absence of mycoplasma contamination using MycoAlert Assay detection kit (Lonza, France).

### **Plasmids constructs and transfections**

Plasmids encoding GFP-ATIP3, mCh-ATIP3, GFP-D1, GFP-D2 and GFP-D3 were described elsewhere [17]. GFP-fused D2 fragments and deletion mutants were obtained by PCR-amplification of ATIP3 sequence or Site-Directed Mutagenesis using oligonucleotides shown in Supplementary Table S3. Expression vectors encoding GST-EB1, GST-EB1-C, GST-EB1-N and GST-EB1- $\Delta$ Ac were gifts of Dr Anna Akhmanova (Utrecht University, The Netherlands). EB1-GFP and GFP-CLIP-170 constructs were provided by Dr Franck Perez (Institut Curie, Paris, France). GFP-MCAK and GFP-MCAK-3E were kindly provided by Dr Michel Steinmetz (Paul Scherrer Institute, Switzerland). All cDNA constructs were transfected (1 to 2  $\mu$ g) for 24h using Dreamfect (Oz Biosciences) or X-treme Gene 9 (Roche).

ATIP3-specific siRNA [15], EB1-specific siRNA (on-target plus smart pool, NM\_012325) and scrambled siRNA were from Dharmacon (ThermoFisher Scientific). All siRNAs (50 nM) were transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) and silencing efficiency was evaluated by immunoblotting using rabbit anti-MTUS1 antibodies (ARP44419; Aviva Systems, CA, USA) and rat anti-EB1 (KT51; Santa Cruz).

### **GST pull-down assays and immunoprecipitations**

Purification of GST fusion proteins and GST pull-down assays from extracts of HeLa cells or MCF7 transiently expressing GFP fusion proteins were performed as described [3,20] using 15-30  $\mu$ g of GST or GST-EB1 beads per experimental condition.

Immunoblotting was using rabbit anti-MTUS1 (ARP44419, Aviva Systems) (1:1000) or monoclonal anti-GFP antibodies (clone 7.1/13.1, Roche) (1:3000).

For *in vitro* interaction, chemically synthesized peptides CN45 and CC coupled to FITC were purchased from GL Biochem (Shanghai, China). Purified peptides were incubated for 1h at room temperature with GST- or GST-EB1 beads in 50mM HEPES containing 150mM NaCl, 0.01% Triton X100 (pH 7.4) then washed in the same buffer. Interaction was assessed by FITC fluorescence measurement using Fusion Universal Microplate Analyzer (Packard BioScience) and with Typhoon™ system (Amersham Biosciences) following 15% SDS-PAGE.

For immunoprecipitation, cell lysates were incubated for 2h at 4°C with 4µg of mouse monoclonal anti-GFP (Roche), or mouse monoclonal anti-mCh (Clontech) antibodies prior to incubation with G protein-sepharose beads. Bound proteins were detected by immunoblotting as described above.

### **Immunofluorescence and live cell imaging**

Transfected RPE-1 cells were fixed with ice-cold methanol and incubated as described with human anti-alpha-tubulin clone F2C [17], rat anti-EB1 (Santa Cruz) or mouse anti-GFP (Roche). Linescan analyses of fluorescence intensity were performed on a 5 µm line along the length of MT plus end [17]. Results shown are representative of 3 to 5 independent experiments. For quantification of comet number, 5 different areas of at least 5 single cells were analyzed in 3 to 5 independent experiments.

For live cell imaging, SV-MRC5 co-transfected for 24h with mCh-ATIP3 and EB3-GFP were imaged by spinning disc confocal microscopy as described in Supplementary Methods. Images were acquired in a stream mode at 500 ms exposure time.

For backtracking experiments, HC7 [17] were imaged using TIRF videomicroscopy as described in Supplementary Methods. Images were acquired in a stream mode at 100 ms exposure time.

### **TIRF microscopy for *in vitro* studies**

Perfusion chambers were functionalized with silane-PEG-biotin (Laysanbio) coverslips and silane-PEG (Creative PEGwork) glass slides as described [36]. The flow cell was firstly perfused with neutravidin (25 µg/ml in 1% BSA/BRB80 (80 mM PIPES, 1 mM GTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 6.75) and secondly with GMPCPP-stabilized, ATTO-565 labelled microtubule seeds. Microtubules assembly was performed at 32°C

from 15  $\mu\text{M}$  brain tubulin (containing 20% ATTO 565-labeled tubulin) in the presence of 100 nM EB1-GFP and 0, 0.05  $\mu\text{M}$  or 1  $\mu\text{M}$  CN45 peptide (GL Biochem, Shanghai, China) in BRB80 buffer supplemented with 4 mM DTT, 1% BSA, 50 mM KCl, 1 mg/ml glucose, 70  $\mu\text{g/ml}$  catalase, 580  $\mu\text{g/ml}$  glucose oxydase, 0.1 % methylcellulose (4,000 centipoise). Dual-color time-lapse imaging was performed on an inverted Eclipse Ti (Nikon) microscope with an Apochromat 60X1.49 N.A oil immersion objective (Nikon), equipped with an ilas2 TIRF system (Roper Scientific), a cooled charged-coupled device camera (EMCCD Evolve 512, Photometrics) and controlled by the MetaMorph 7.7.5 software (Molecular Devices). For excitation we used 491- and 561-nm lasers. Time-lapse imaging was performed at 1 frame per 2 s with an 80-ms exposure time, during 30 minutes.

The image analysis was performed with ImageJ software, version 1.43u (W. Rasband, NIH. USA). The comet fluorescence intensities were measured over the tubulin polymerization periods using kymographs with background subtraction (protocol based on [8]). The average fluorescence intensity at microtubule growing ends was measured in the green channel with a 5-pixel-wide line. Only comet fluorescence intensity differences superior to one background standard deviation were included in the calculation. Comparisons of fluorescence intensities with and without CN45 were calculated from experiments performed with the same acquisition set-up and laser intensity. Microtubule dynamic parameters were determined on kymographs using Image J software, version 1.43u (W. Rasband, NIH. USA). Statistical analyses were done with Prism 6.0 (GraphPad software, USA).

### **Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis**

HeLa cells were co-transfected with appropriate siRNA (72h) and EB1-GFP (24h). FRAP analyses were performed after bleaching MT ends, or selected cytosolic regions, and recovery was measured as described in Supplementary informations. To calculate the recovery of EB1-GFP fluorescence after photobleaching, the fit of the fluorescence decay was subtracted to the normalized curve to obtain a curve with only the mean fluorescence recovery. This curve could be fitted with the first-order exponential decay with a robust fitting routine:  $y = (y_0 - \text{plateau}) * \exp^{(-k_{\text{recovery}}*x)} + \text{plateau}$ , where  $y$  is normalized intensity,  $y_0$  is the initial fluorescence value, plateau is the  $y$  value at infinite times,  $(y_0 - \text{plateau})$  is the span of the reaction,  $k_{\text{recovery}}$  is the reaction constant and  $x$  is

the time. Half-time of recovery was calculated as  $\ln(2)/k_{\text{recovery}}$ . Association time (Tau) was calculated as  $1/k_{\text{recovery}}$ .

### **Proximity Ligation Assay (PLA)**

*In situ* PLA detection was carried out using DUOLINK II In Situ Far Red kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). HeLa cells were transfected (72h) with appropriate siRNAs, fixed and incubated with rabbit anti-MTUS1 (ARP44419, Aviva Systems, 1:300) and mouse anti-EB1 (clone 5, BD Bioscience, 1:1000) antibodies. Transfected RPE-1 cells (24h) were fixed with ice-cold methanol and incubated with rabbit anti-GFP (Roche, 1:10000) and mouse anti-EB1 (clone 5, BD Bioscience, 1:1000) antibodies. Cells were incubated with duolink PLA Probes anti-mouse PLUS and anti-rabbit MINUS (1:5) for 1h at 37°C and processed for ligation and rolling circle amplification (RCA) in the presence of cy5-labeled oligonucleotide probe according to manufacturer's protocol. Imaging was performed using a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope with 100x oil objective and controlled using Metamorph 7.1.7 software. For quantification of RCP number, 5 different areas of at least 6 single cells from 3 independent experiments were analyzed.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were done using GraphPad Prism software. Data in bar graphs (mean +/- SD) and dot plots were analyzed using two-tail unpaired t-test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **Acknowledgements**

We thank Dr. Anna Akhmanova (Utrecht University, The Netherlands) and Dr. Matthieu Piel (Institut Curie, Paris, France) for helpful advice and discussion. We are grateful to Cynthia Seiler for excellent technical assistance. We thank the Institut Cochin, Institut Curie and Institut Gustave Roussy imaging facilities.

### **Fundings**

Ludovic Leconte was supported by the Labex CellTissPhyBio. This work was supported by Inserm, CNRS, Roche SAS, the Ligue Contre le Cancer Comité Ile de France, the Institut Gustave Roussy, Odyssea and Prolific.

### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

1. Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 309–322.
2. Galjart N. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol.* 2010; 20: R528–537.
3. Honnappa S, et al. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell.* 2009; 138: 366–376.
4. Slep KC. Structural and mechanistic insights into microtubule end-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22: 88–95.
5. Jiang K, et al. A Proteome-wide screen for mammalian SxIP motif-containing microtubule plus-end tracking proteins. *Curr Biol.* 2012; 22: 1800-1807.
6. Kumar P, Wittmann T. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol.* 2012; 22: 418–428.
7. Dixit R, Barnett B, Lazarus JE, Tokito M, Goldman YE, Holzbaaur EL. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2009; 106: 492-497.
8. Maurer SP, Bieling P, Cope J, Hoenger A, Surrey T. GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2011; 108: 3988-3993.
9. Maurer SP, Fourniol JF, Bohner G, Moores CA, Surrey T. EBs Recognize a Nucleotide-Dependent Structural Cap at Growing Microtubule Ends. *Cell.* 2012; 149: 371-382.
10. Tirnauer JS, Grego S, Salmon ED, Mitchison TJ. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 3614-3626.
11. Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol.* 2008; 183: 1223-1233.
12. Dragestein KA, van Cappellen WA, van Haren J, Tsibidis GD, Akhmanova A, Knoch TA, Grosveld F, Galjart N. Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *J Cell Biol.* 2008; 180: 729–737.

13. Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Gouveia SM, Munteanu EL, Schober JM, Honnappa S, Buey RM, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol.* 2009; 184: 691–706.
14. Maurer SP, Cade NI, Bohner G, Gustafsson N, Boutant E, Surrey T. EB1 Accelerates Two Conformational Transitions Important for Microtubule Maturation and Dynamics. *Current Biology.* 2014; 24: 372–384.
15. Rodrigues-Ferreira S, et al. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One.* 2009; 4: e7239.
16. Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C. An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010; 21: 684–690.
17. Molina A, et al. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res.* 2013; 73: 2905–2915.
18. Buey RM, et al. Sequence determinants of a microtubule tip localization signal (MtLS). *J Biol Chem.* 2012; 287: 28227–28242.
19. Montenegro Gouveia S, Leslie K, Kapitein LC, Buey RM, Grigoriev I, Wagenbach M, Smal I, Meijering E, Hoogenraad CC, Wordeman L, Steinmetz MO, Akhmanova A. In vitro reconstitution of the functional interplay between MCAK and EB3 at microtubule plus ends. *Curr Biol.* 2010; 20: 1717–22.
20. Y, Lansbergen G, Galjart N, Grosveld F, Borisy GG, Akhmanova A. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol Biol Cell.* 2005; 16: 5334–5345.
21. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods.* 2006; 3: 995–1000.
22. Tortosa E, Galjart N, Avila J, Sayas CL. MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J.* 2013; 32: 1293–1306.
23. Sayas CL, Tortosa E, Bollati F, Ramírez-Ríos S, Arnal I, Avila J. Tau regulates the localization and function of End-binding proteins 1 and 3 in developing neuronal cells. *J Neurochem.* 2015; 133: 653–667.

24. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression. *Nature*. 2011; 473: 337-342.
25. Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymborska A, Herzog F, Rinner O, Ellenberg J, Aebersold R. The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol*. 2011; 7: 549.
26. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. 2011; 7: 548.
27. Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Kondo T. Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 48: 1851-1863.
28. Dong X, Liu F, Sun L, Liu M, Li D, Su D, Zhu Z, Dong JT, Fu L, Zhou J. Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J Pathol* 2010; 220: 361-369.
29. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Sakamoto K, Nakamura Y, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T. Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J Proteomics*. 2012; 75: 5342-5355.
30. Stypula-Cyrus Y, Mutyal NN, Dela Cruz M, Kunte DP, Radosevich AJ, Wali R, Roy HK, Backman V. End-binding protein 1 (EB1) up-regulation is an early event in colorectal carcinogenesis. *FEBS Letters*. 2014; 588: 829-835.
31. Berges R, Baeza-Kallee N, Tabouret E, Chinot O, Petit M, Kruczynski A, Figarella-Branger D, Honore S, Braguer D. End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to Vinca-alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2014; 5: 12769-12787.
32. Wen Y, Eng CH, Schmoranzer J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 820-830.
33. Green RA, Wollman R, Kaplan KB. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 4609-4622.
34. Pfister AS, Hadjihannas MV, Röhrig W, Schambony A, Behrens J. Amer2 protein interacts with EB1 protein and adenomatous polyposis coli (APC) and controls microtubule stability and cell migration. *J Biol Chem*. 2012; 287: 35333-353340.

35. Li D, Gao J, Yang Y, Sun L, Suo S, Luo Y, Shui W, Zhou J, Liu M. CYLD coordinates with EB1 to regulate microtubule dynamics and cell migration. *Cell Cycle*. 2014; 13: 974-983.
36. Portran D, Zoccoler M, Gaillard J, Stoppin-Mellet V, Neumann E, Arnal I, Martiel JL, Vantard M. MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Mol Biol Cell*. 2013; 24: 1964–1973.



## Figure Legends

### Figure 1. ATIP3 interacts with EB1

(A). MCF7 cells were transfected with mCh-ATIP3 (or mCh) and EB1-GFP (or GFP) and immunoprecipitation was performed using anti-GFP or anti-mCh antibodies as indicated. Western blots were probed with anti-MTUS1 and anti-GFP antibodies to reveal mCh-ATIP3 (210 KDa) and EB1-GFP (55 KDa). IgGH: Immunoglobulin heavy chain.

(B). GST pull-down assays of MCF7 cell lysates transiently expressing GFP-ATIP3 or GFP using GST or GST-EB1 beads as indicated. Blots were probed with anti-GFP antibodies. An asterisk indicates cleavage product of GFP-ATIP3. Lower panel: GST beads loading.

(C). Purified GST-EB1 beads were used to precipitate GFP-ATIP3 (210 KDa) and endogenous ATIP3 (180 KDa) expressed in HeLa cells. Blots were probed with anti-MTUS1 antibodies. Lower panel: GST beads loading.

(D). Schematic representation of ATIP3 protein illustrating the position of D1, D2 and D3 regions. CC: coiled coil region. Position of the SAIP motif (residues 1249-1252) is shown. Amino acid numbering is from Accession number NP\_001001924. Lower panel: Schematic drawing of ATIP3 deletion mutants and their ability (+) or not (-) to bind EB1 and MTs.

(E). GST-pull-down assays of MCF7 cell lysates expressing GFP-fused D1, D2, D3 regions as in (B).

(F). Pull-down assays of MCF7 cell lysates expressing GFP-ATIP3 or GFP-D2, using GST-EB1, GST-EB1-C and GST-EB1-N as indicated (left panel) or following treatment with 10  $\mu$ M nocodazole (Nz) or vehicle (Ctrl) for 1h at 4°C (right panel). Blots were probed as in (B).

(G). Pull-down analysis of GFP-D2 fragments using GST and GST-EB1 beads as in (B). Molecular weights (KDa) are on the left.

(H) Pull-down analysis of ATIP3 deletion mutants using GST-EB1. Blots were probed with anti-GFP antibodies as in (B). Lower panel : GST beads loading.

(I). *In vitro* pull-down assay using GST (white bars) or GST-EB1 (black bars) beads and 10 or 15  $\mu$ g of synthetic fluorescent CN45 and CC peptides as indicated below. Upper panel: fluorescence intensity (arbitrary units) in the precipitates. Lower panel:

fluorescence was detected in samples before (input) and after GST pull-down, using Typhoon scanner following resolution on 15%SDS-PAGE.

### **Figure 2. Cellular localization of GFP-D2 and deletion mutants**

Immunofluorescence imaging of RPE-1 cells expressing GFP-D2 and GFP-tagged deletion mutants as indicated. Cells were fixed and stained with anti-GFP (green), anti-alpha-tubulin (red) antibodies and DAPI (blue). Enlarged portions of the selected areas are shown in the insets. Red arrowheads show MT-localization of GFP-fusion proteins. Scale bar, 10 $\mu$ m.

### **Figure 3. *In situ* interaction between ATIP3 and EB1**

**(A).** RPE-1 cells transfected with low amounts of GFP-ATIP3 were fixed and stained with anti-GFP (green) and anti-EB1 (red) antibodies. Insets show that EB1 comet-like structures at plus ends are not stained by GFP-ATIP3. Magnification 100X. Scale bar 10 $\mu$ m.

**(B).** PLA performed in HeLa cells transfected with control (siCtrl), ATIP3-specific (siATIP3) or EB1-specific (siEB1) siRNA as indicated. Silencing efficiency was assessed by immunoblotting with anti-MTUS1 (ATIP3), anti-EB1 and anti-tubulin (Tub) antibodies. Molecular proximity between endogenous ATIP3 and EB1 was analyzed using rabbit anti-MTUS1 and mouse anti-EB1 primary antibodies and revealed as red signals of RCP stained with cy5-labeled oligonucleotide probe. Cells were stained with anti-alpha-tubulin antibodies to reveal the MT network. Shown are merge pictures of tubulin (green), RCP (red) and nuclei (blue) staining. Scale bar 10 $\mu$ m. Inset: enlarged portion of a selected area from siCtrl-transfected cell. The arrowhead illustrates alignment of RCP signals along the MT lattice. Right panel: quantification of the number of RCP per area (100  $\mu$ m<sup>2</sup>). Number of areas analyzed (5 areas from at least 6 different cells in 3 independent experiments) is under brackets. \*\*\* p<0.0001.

**(C).** PLA performed in RPE-1 cells transfected with GFP-tagged ATIP3 regions and deletion mutants as indicated on the left, using rabbit anti-GFP and mouse anti-EB1 primary antibodies. Shown are merge pictures of GFP (green), RCP (red) and nuclei (blue) staining. Scale bar 10 $\mu$ m. Inset: enlarged portions of selected areas. Arrowheads illustrate alignment of RCP signals along the MT lattice.

**(D).** Quantification of the number of RCP per area (100  $\mu$ m<sup>2</sup>) as in (B). Five areas from at least 6 single cells in 3 independent experiments were analyzed. \*\*\* p<0.0001.

**Figure 4. Effect of deletion mutants on EB1 comet formation and cell polarity**

(A). Anti-EB1 (green) and anti-tubulin (red) immunostaining of RPE-1 cells transiently transfected with GFP-D2 and GFP-tagged regions. Insets: EB1 comet-like structures in enlarged portions of selected areas. Red arrowheads illustrate weak EB1 staining along the MT lattice. Right panels show distribution of EB1 (green) and alpha-tubulin (red) at the microtubule plus ends (linescans), and quantification of number of comets (per  $62\mu\text{m}^2$  area) and comet length (scattered dot plot) from 5 single cells in 3 to 5 independent experiments. Number of comets analyzed is under brackets. NT: non-transfected. Scale bar,  $10\mu\text{m}$ . \*\*\*  $p < 0.0001$ .

(B). Immunofluorescence imaging of migrating MCF-7 cells transfected with GFP constructs as indicated. Cells were allowed to polarize for 3 hrs, then fixed and stained with anti-GFP (green), anti- $\alpha$ -tubulin (white) antibodies and DAPI (blue). Arrows indicate the direction of migration. Right panel shows quantification (percent) of polarized MCF-7 cells from 3 to 6 fields, in 2 independent experiments. Number of cells analyzed is under brackets. Scale bar,  $10\mu\text{m}$ . \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

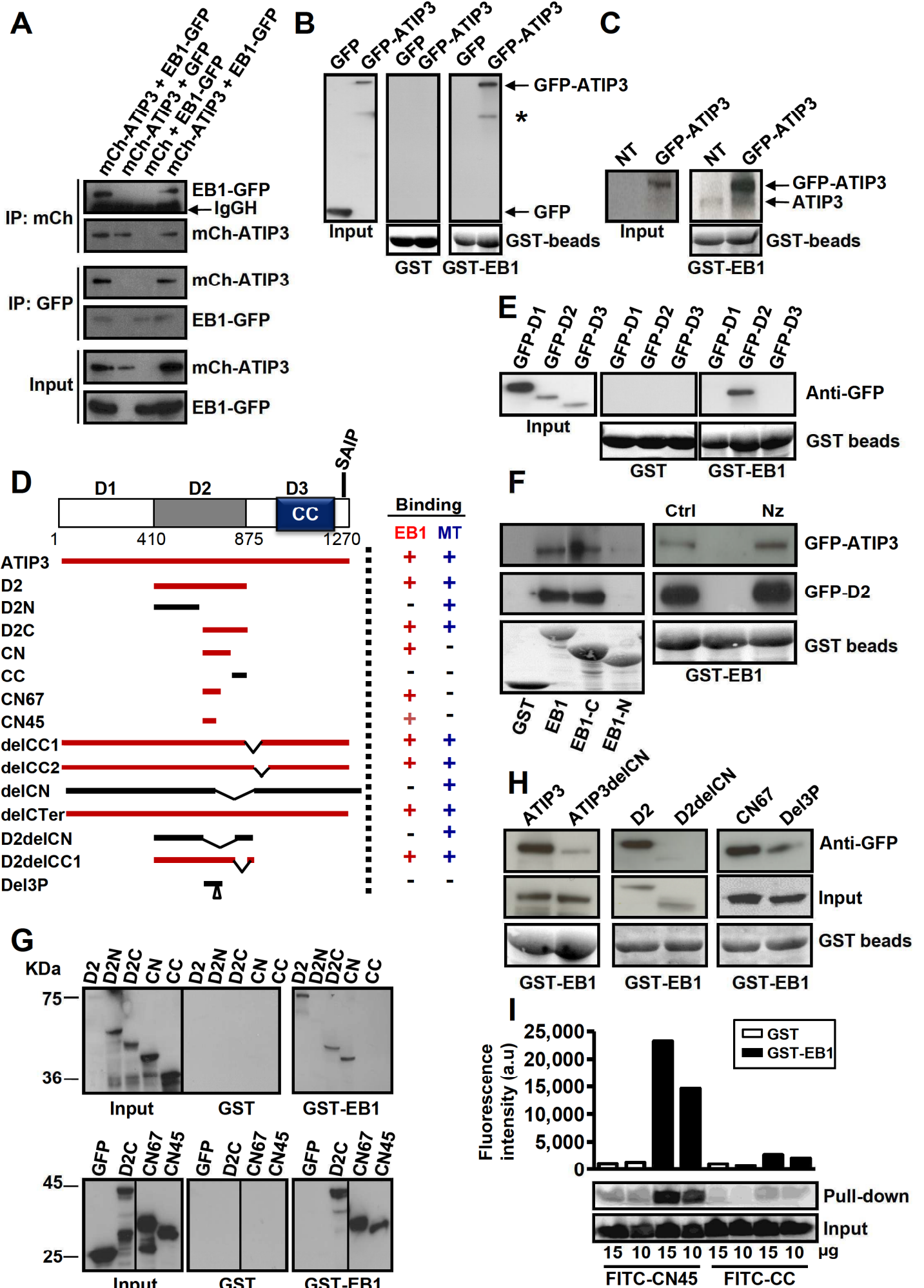
**Figure 5. ATIP3 silencing increases EB1-GFP exchange on MT ends**

(A). Representative example of time lapse imaging of HeLa cells expressing EB1-GFP. Fluorescence was bleached at the distal part of the MT in control (siCtrl, upper) and ATIP3-silenced (siATIP3, lower) cells. Red arrowhead indicates position of the bleached comet. Fluorescence intensity of the bleached comet (middle panel) and fluorescence recovery curves (right panel) are shown. Red line in middle and right panels indicates fluorescence decay and recovery, respectively.

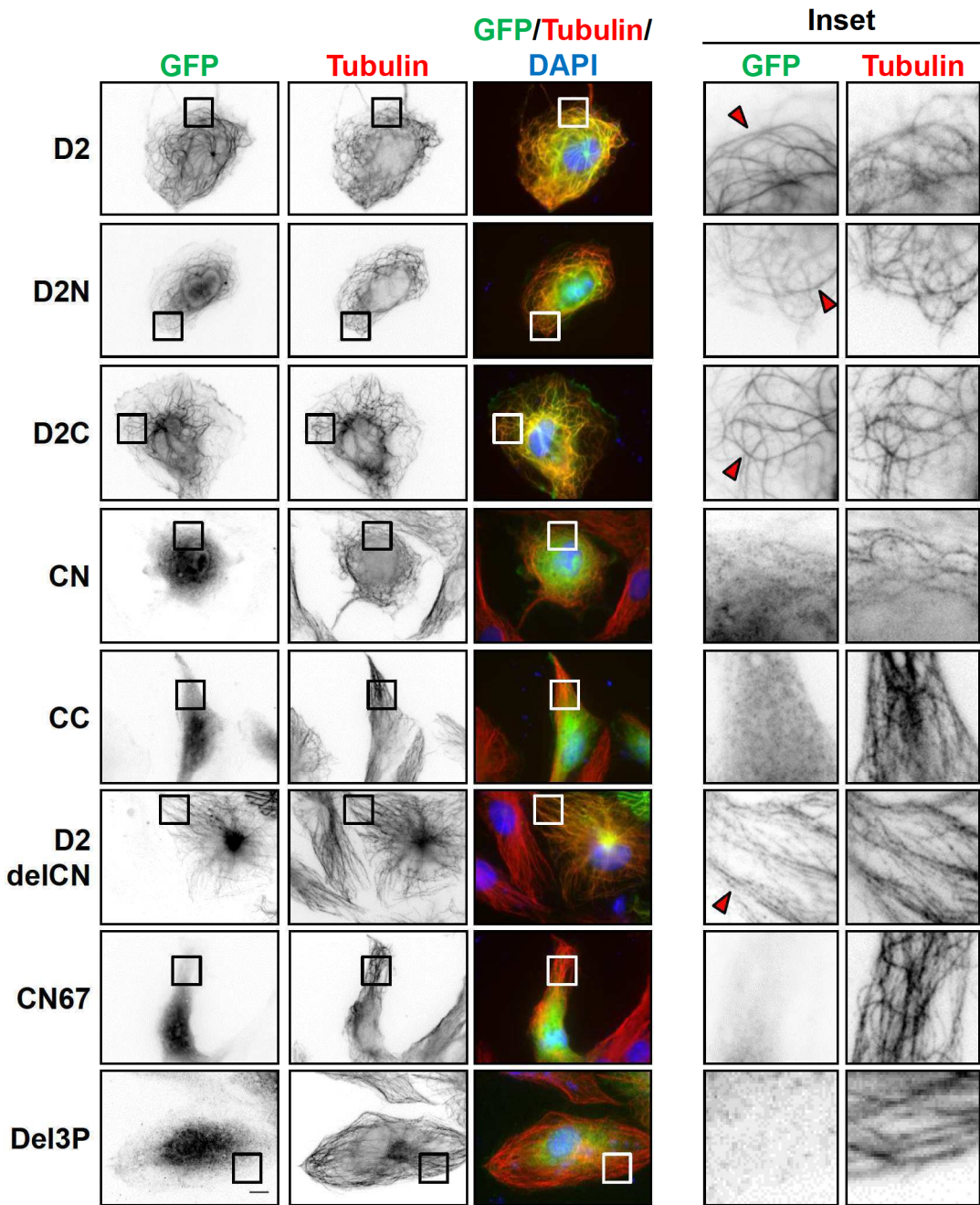
(B) Quantification of association time Tau in seconds (s), half-time of recovery in seconds (s), and  $k_{\text{recovery}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) of fluorescence recovery in control cells (n=17) and ATIP3-depleted cells (n=16) in 2 independent experiments. Number of EB1-GFP bleached comets analyzed is under brackets.

(C). Box-n-Whisker plot showing fluorescence intensity of EB1-GFP at microtubule plus ends in the presence of purified EB1-GFP (100 nM) and increasing amounts of CN45 peptide as indicated. Figure was generated with PRISM 6.0. Shown is one representative experiment out of 3. Number of comets appearing over 30 minutes is under brackets. Right panel : Kymographs representing MT assembly in the presence of tubulin (15  $\mu\text{M}$ ), EB1-GFP (100 nM) and increasing amounts of CN45 peptide. Tubulin and EB1-GFP are

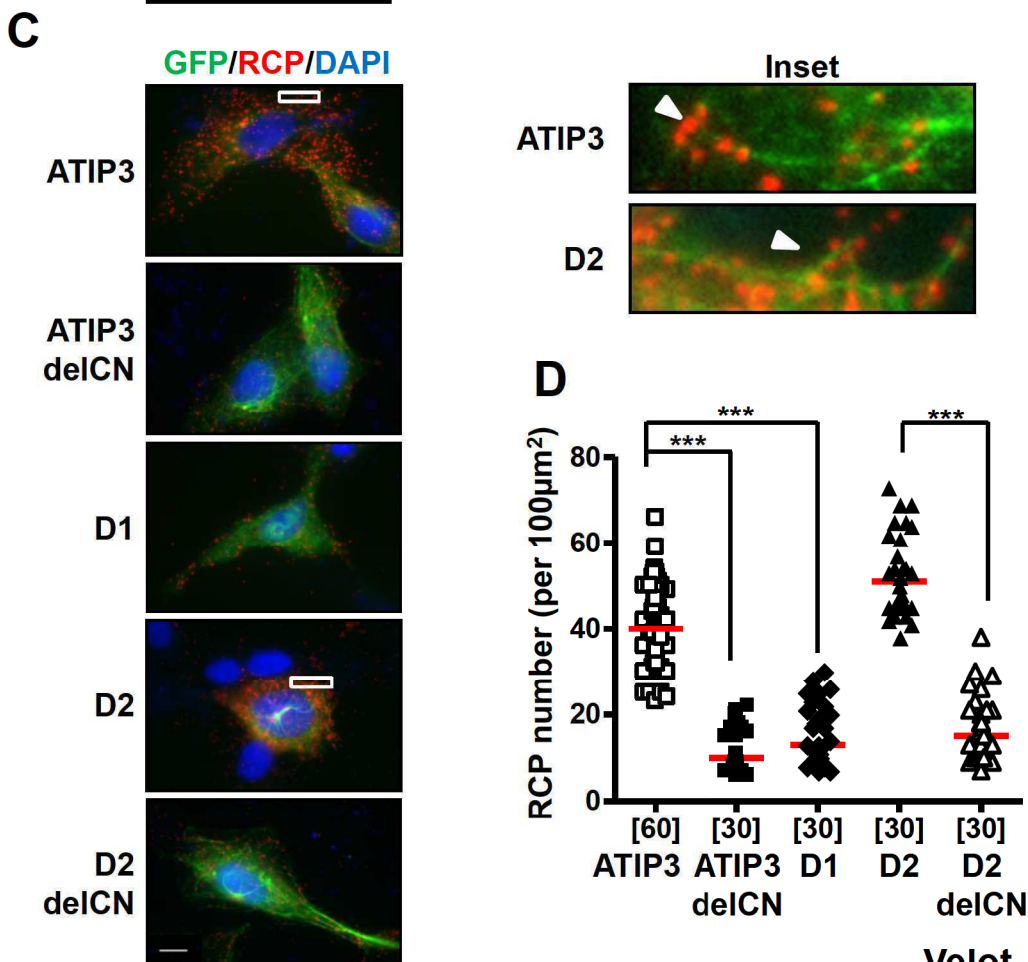
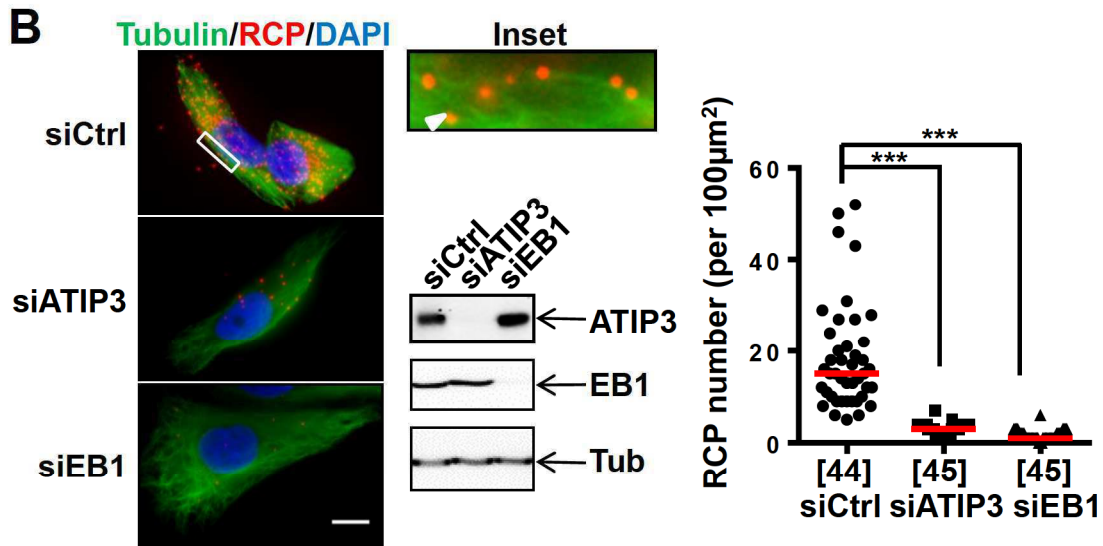
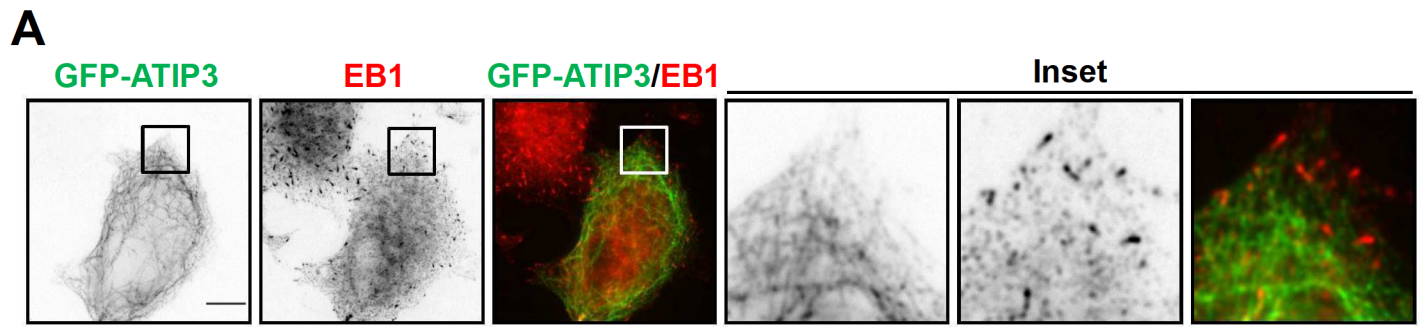
detected by fluorescence (tubulin in red and EB1-GFP in green). Shown is one representative out of 3 independent experiments.

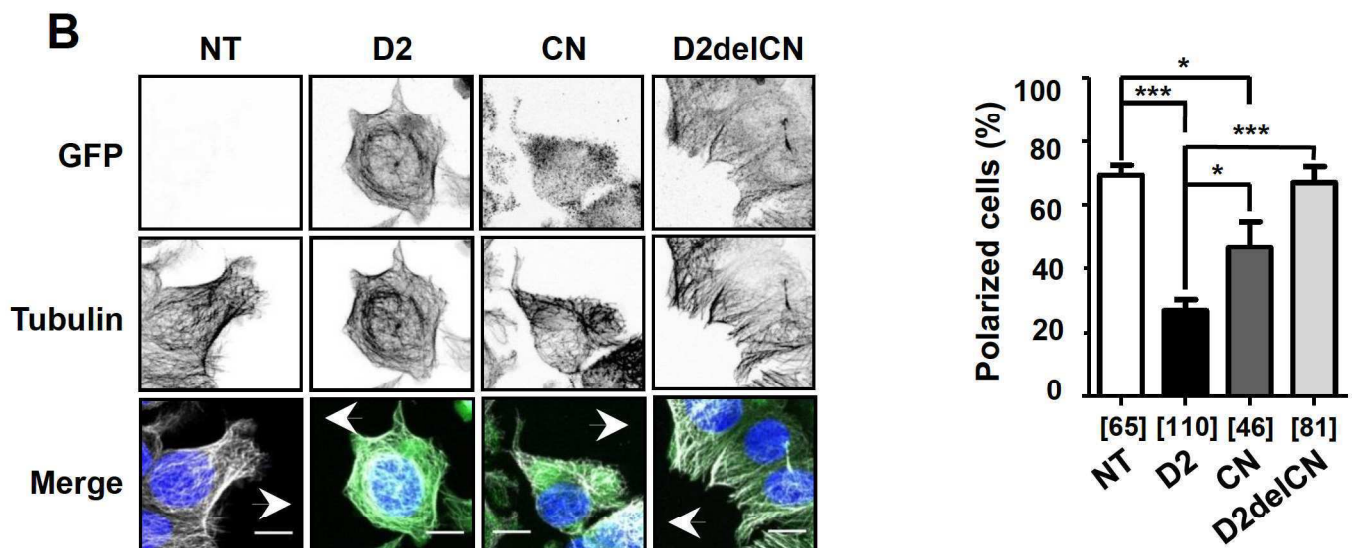
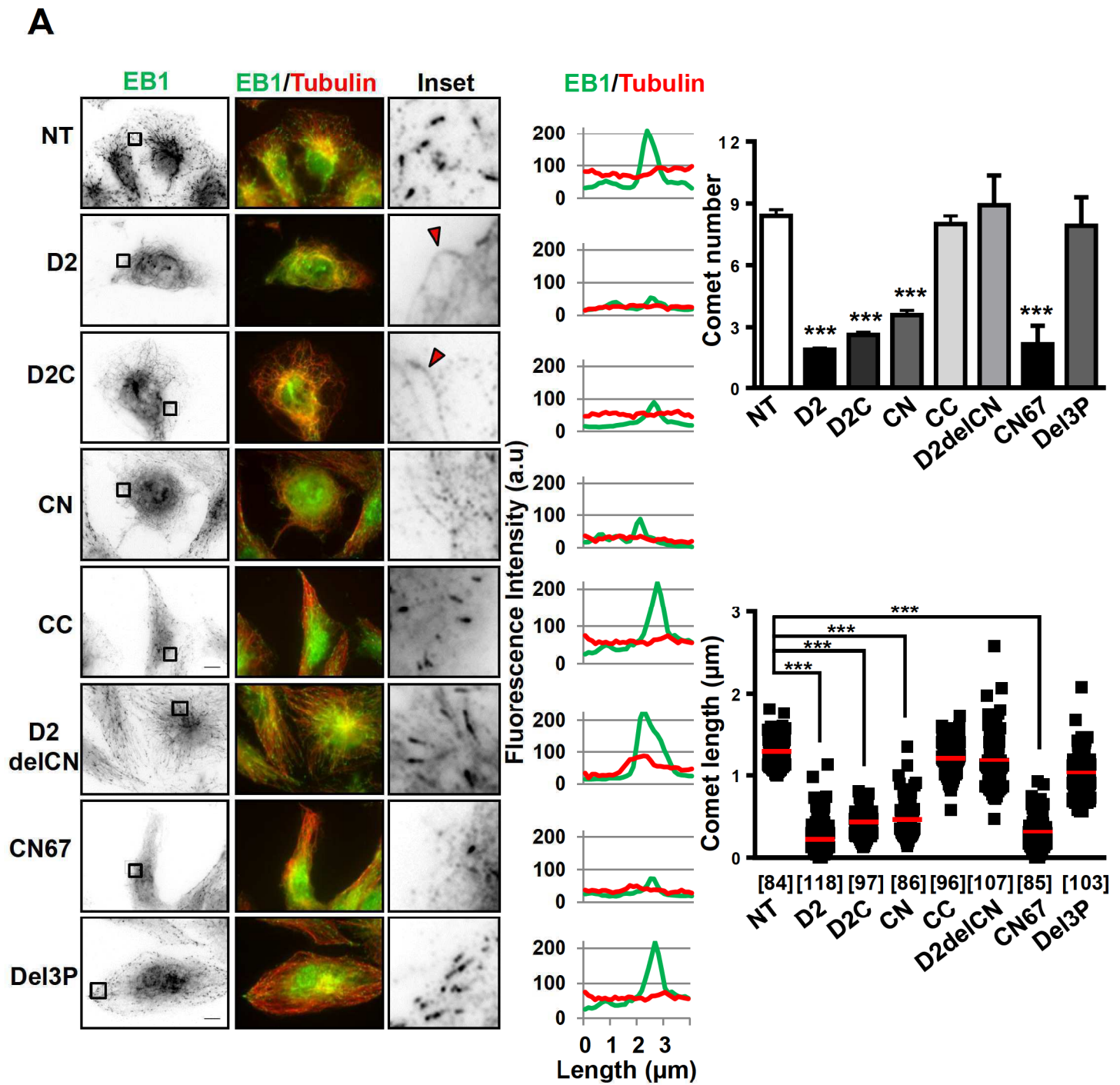


Velot, Molina et al., Figure 1

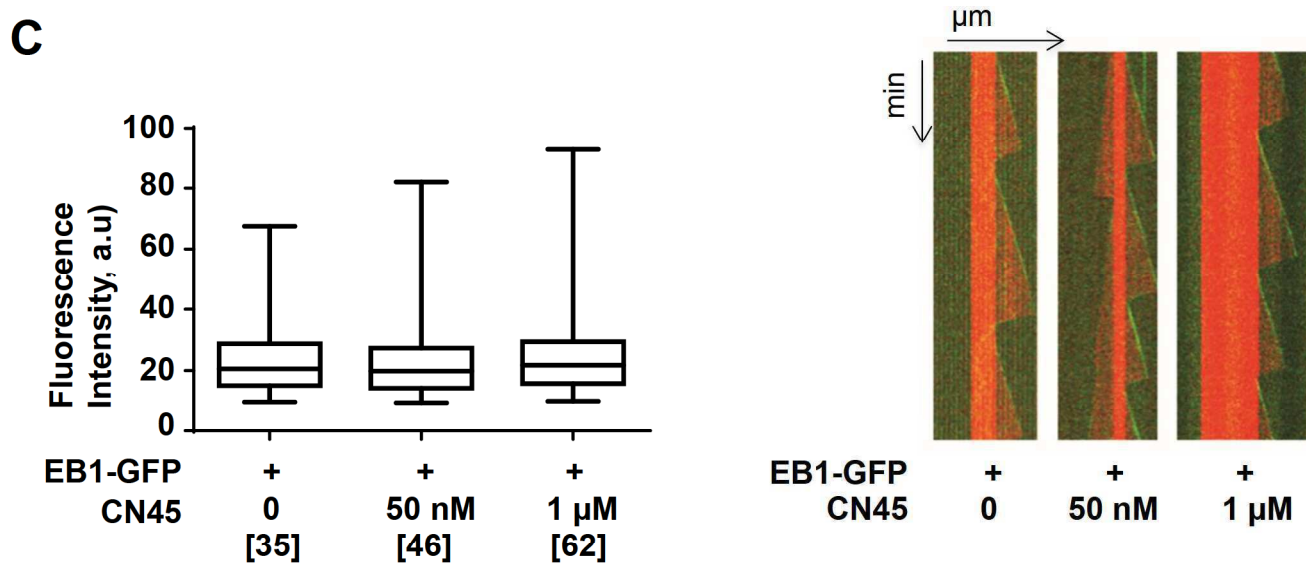
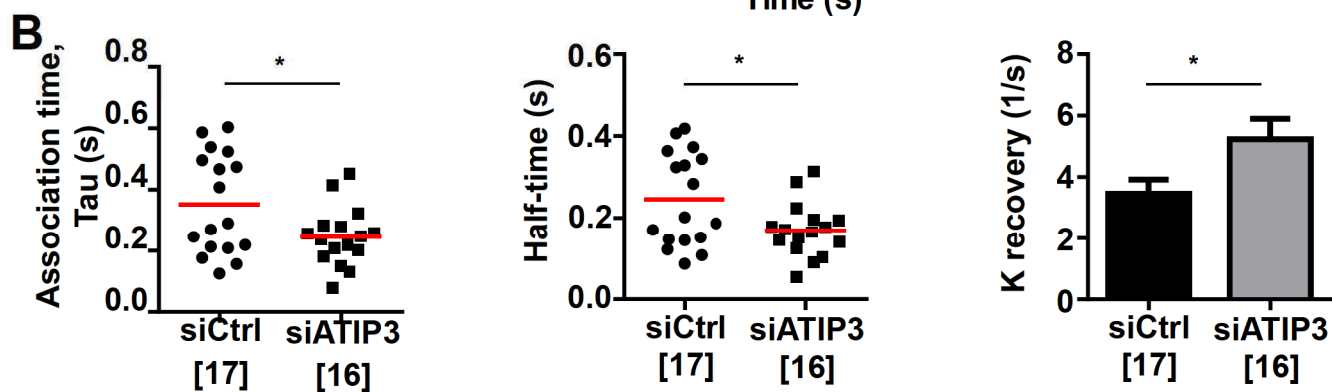
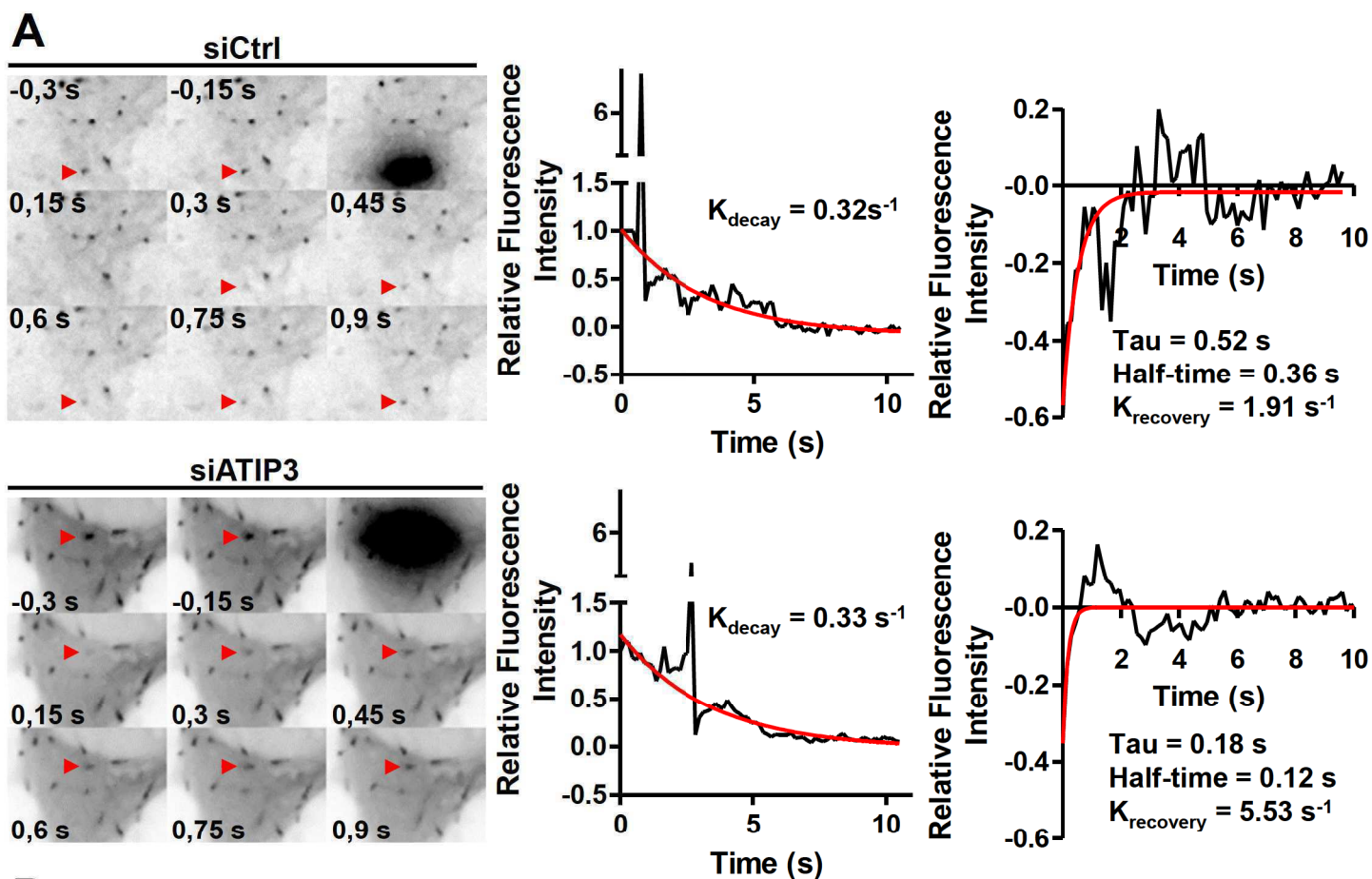


Velot, Molina et al., Figure 2









# **Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3**

## **Supplementary Material**

### **Cell lines, plasmids and transfections**

RPE-1 cells stably expressing EB1-GFP were a kind gift of Dr Matthieu Piel (Institut Curie, Paris, France). SV-MRC5, MCF7, HC7, HeLa and RPE-1 cells were described elsewhere [1]. All cells were used at passages 2 to 20 after thawing and grown as described [1]. Cells were routinely authenticated by morphologic observation and tested for absence of mycoplasma contamination using MycoAlert Assay detection kit (Lonza, France).

EB3-GFP and GFP-EB3 constructs (described in [2]) and expression vector encoding GST-EB1- $\Delta$ Ac [3] were kind gifts of Dr Anna Akhmanova (Utrecht University, The Netherlands).

For rescue experiments of ATIP3 knock-down, HeLa cells were transfected with specific ATIP3-siRNA (sens strand UGG CAG AGG UUU AAG GUU A) that targets the 5' untranslated sequence of ATIP3 and allows expression of wild type ATIP3 coding sequence.

### **Live cell imaging**

SV-MRC5 co-transfected for 24h with mCh-ATIP3 and EB3-GFP were imaged by spinning disc confocal microscopy on a Nikon Ti-E (Nikon) with perfect focus system (PFS, Nikon) equipped with a Plan APO VC 60x 1.40 N.A. oil objective, a Yokogawa motorized CSU-X1-A1 confocal head, a Photometrics Evolve 512 EMCCD camera (Roper Scientific) and controlled with MetaMorph 7.5 software (Molecular Devices). For simultaneous excitation of GFP and mCh we used 491nm 50mW Calypso (Cobolt) and 561nm 50mW Jive (Cobolt) lasers together with a DV2 beam splitter (MAG Biosystems, Roper) equipped with a dichroic filter 565dcsr (Chroma) and a HQ630/50m emission filter (Chroma). To keep cells at 37°C we used a stage top incubator (model INUG2E-ZILCS, Tokai Hit). Time lapse inset images were denoised using the ImageJ Safir Filter plugin [4]. Four iterations and a patch size of 1 were used as parameters of the denoising process.

For backtracking experiments, HC7 cells that stably express moderate levels of GFP-ATIP3 [1] were imaged on a Nikon Eclipse Ti-E with the PFS, equipped with a Nikon CFI Apo TIRF 100X 1.49 N.A. oil objective (Nikon), a TIRF-E motorized TIRF illuminator modified by Roper Scientific France/PICT-IBiSA (Institut Curie, Paris, France), a stage top incubator

(model INUG2E-ZILCS, Tokai Hit) set at 37°C, a Photometrics Evolve 512 EMCCD camera and controlled with MetaMorph 7.7 software. For excitation of GFP we used a Cobolt Calypso 491 nm (100 mW) laser and green fluorescent light was collected via a ET-GFP filter set (Chroma). Inset montages were denoised using the ImageJ Safir Filter plugin [3]. Four iterations and a patch size of 1 were used as parameters of the denoising process.

For analysis of EB1 decoration time, EB1 comet length and MT growth rate were measured from time-lapse TIRF videomicroscopy analysis (2 independent experiments) of HeLa cells co-transfected with EB1-GFP and control (siCtrl, n=10 cells) or ATIP3-specific (siATIP3, n=7 cells) siRNAs, as described previously [1].

### **Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analyses**

FRAP was performed on an inverted Ti-E (Nikon) Nikon spinning disk microscope. EB1 comets were bleached using a FRAP-on-fly-spiral option (Roper Scientific France/PICT-IBiSA), which allows bleaching of a selected circular region of 0.5  $\mu\text{m}$  in diameter. We used 100% (7-15  $\text{kW}/\text{cm}^2$ ) of 491nm laser power for photobleaching. Time-lapse images were acquired for at least 3s before bleaching and for 10s after bleaching. Image acquisition was done at 150 ms of exposure.

For analysis, Safir software (Roper Scientific France) was used to denoise time-lapse images. Fluorescence recovery was measured in a region of 2 x 2 pixels that comprised part of the fluorescent MT end. Bleached MT ends and non-bleached cytoplasmic regions (background) were analyzed. To derive exponential decay curves for EB1-GFP, cytoplasmic background values were subtracted, and curves were normalized to 1. The average decay of fluorescence peaks was fitted as a first-order exponential decay with a robust fitting routine:  $y = (y_0 - \text{plateau}) * \exp^{(-k_{\text{decay}}*x)} + \text{plateau}$ , where y is normalized intensity,  $y_0$  is the initial fluorescence value, plateau is the y value at infinite times,  $(y_0 - \text{plateau})$  is the span of the reaction,  $k_{\text{decay}}$  is the reaction constant, and x is the time. Quantification was performed on bleached comets of 17 cells (siCtrl) and 16 cells (siATIP3) from 2 independent experiments.

The same experimental procedure and analysis were used to measure fluorescence recovery of cytosolic EB1-GFP signals, except that bleaching was performed in selected regions (2 x 2 pixels) of the cytosol.

## **Proximity Ligation Assay**

In situ PLA detection was carried out using DUOLINK II In Situ Far Red kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). RPE-1 cells stably expressing EB1-GFP were transfected for 24h with mCh or mCh-ATIP3, fixed in ice-cold methanol and incubated with rabbit anti-mCh (Clontech, 1:500) and/or mouse anti-GFP (Roche, 1:200) antibodies. Incubation with PLA probes and RCP analysis were performed as described in the Methods section.

## **Supplementary References**

1. Molina A, et al. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res.* 2013; 73: 2905–2915.
2. Stepanova T, Slemmer J, Hoogenraad CC, Lansbergen G, Dortland B, De Zeeuw CI, Grosveld F, van Cappellen G, Akhmanova A, Galjart N. Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J. Neurosci.* 2003; 23:2655–2664.
3. Komarova Y, Lansbergen G, Galjart N, Grosveld F, Borisy GG, Akhmanova A. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol Biol Cell.* 2005; 16: 5334–5345.
4. Kervrann C, Boulanger J. Optimal spatial adaptation for patch-based image denoising. *IEEE Trans Image Process.* 2006; 15: 2866–2878.

Supplementary Table S1. Characterization of ATIP3 domains and deletion mutants

<b>Sequence</b>	<b>Positions (AA)</b>	<b>Length (AA)</b>	<b>EB1 binding</b>	<b>MT localization</b>	<b>Loss of EB1 comets</b>
ATIP3	1-1270	1270	+	+	+
D2	410-874	465	+	+	+
D2N	410-634	225	-	+	nd
D2C	705-874	170	+	+	+
CN	705-816	112	+	+/-	+
CC	817-874	58	-	-	-
CN67	743-809	67	+	-	+
CN45	755-799	45	+	-	+
ATIP3delCN	[1-704]+[817-1270]	1158	-	+	nd
D2delCN	[410-704]+[817-874]	353	-	+	-
D2delCC1	[410-816]+[867-874]	413	+	nd	nd
delCC1	[1-816]+[869-1270]	1218	+	nd	nd
delCC2	[1-867]+[875-1270]	1263	+	nd	nd
delCTer	1-1240	1240	+	nd	nd
Del3P	[743-777]+[783-809]	61	-	-	-

AA: amino acids. Positions are according to accession number NP\_001001924; nd: not determined.

Supplementary Table S2. *In vitro* microtubule dynamics in the presence of EB1-GFP and CN45 peptide

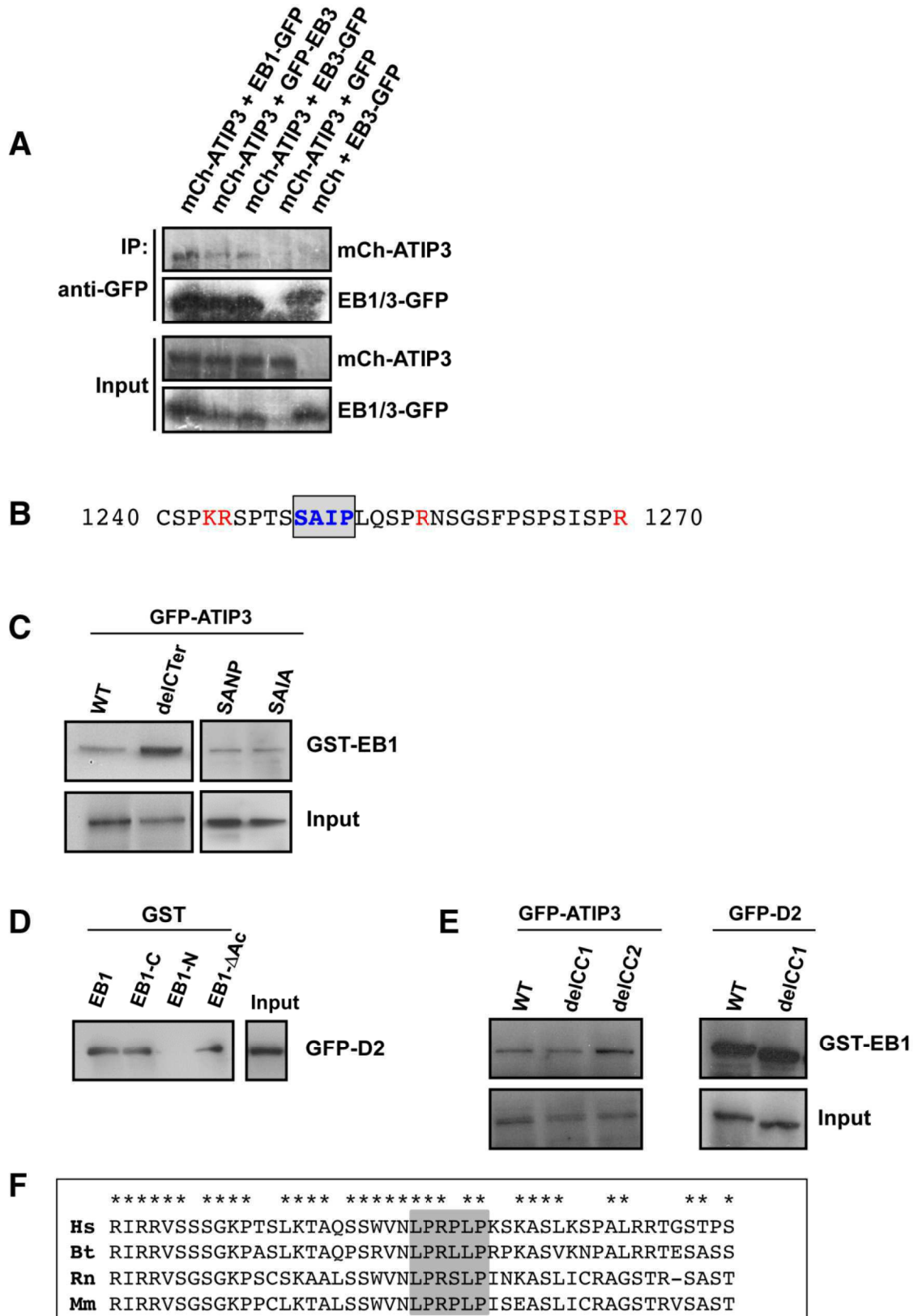
	Growth rate $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$	Shortening rate $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$	Catastrophe frequency $\text{events}\cdot\text{min}^{-1}$
EB1-GFP 100 nM	$2,15 \pm 0,36$ n=43	$29,51 \pm 9,78$ n=38	0,282 n=39
EB1-GFP 100 nM + CN45 50nM	$2,16 \pm 0,34$ n= 60	$31,18 \pm 9,81$ n=55	0,254 n=60
EB1-GFP 100 nM + CN45 $1\mu\text{m}$	$2,15 \pm 0,38$ n=65	$33,81 \pm 9,99$ n=56	0,249 n=60

Growing and shortening rates were determined from kymograph slopes corresponding to individual growth or shrinkage phases (mean  $\pm$  SD). Catastrophe frequencies were calculated as the number total of events divided by time spent in growth. n, number of events measured for each condition. Rescue events were not detected. The total time of measurements (growing and shrinkage phases) were: 149,14 min, 253,64 min and 255,81 min for EB1-GFP 100 nM, EB1-GFP 100 nM + CN45 50 nM and EB1-GFP 100 nM + CN45  $1\mu\text{M}$ , respectively.

Supplementary Table S3: Oligonucleotides used for constructing ATIP3 domains and mutants

Name	Aim	Primers (5' → 3')	Number	Size (bp)
D2	PCR	F : CCGCTCGAGGA CTGACTTGGGATGCAAATGAT R : CGGGGTACCTCATGCATTAAGAGCTGTAAATAA	C 206 C 208	1395
D2N	PCR	F : CCG CTCGAGGACTGACTTGGGATGCAAATGAT R : CGGGGTACCTCAAAAACAACGCAGAAACGGACCCGGT	C 206 C 304	675
D2C	PCR	F : CCGCTCGAGCAACCACCTCAGGTAGGAATATATCC R : CGGGGTACCTCATGCATTAAGAGCTGTAAATAA	C 306 C 208	510
CN	PCR	F : CCGCTCGAGCAACCACCTCAGGTAGGAATATATCC R : CGGCGGGGTACCTCAATTGTTGCTGTAAGTGCTCAGCTC	C 746 C 791	336
CC	PCR	F : GGCCCCGCTCGAGGATCTGGTAATGCCGCTGTCATC R : CGGGGTACCTCATGCATTAAGAGCTGTAAATAA	C 793 C 208	174
CN67	PCR	F : GCCCCGCTCGAGGAAGAAATCCCAGTGCTGATCGAGCC R : CGGCGGGGTACCTCACTCACTGTGGGTGCTGGCTATTGA	C 987 C 988	201
CN45	PCR	F : GGCCCCGCTCGAGGAAGGATCAGGCGTGTGTCCAG R : CGGCGGGGTACCTCAGCTTCCTGTCCTCCGCAGCGC	C 1022 C 1023	135
Del3P	SDM	F : GCACAGTCGTCATGGGTGAATAAAATCCAAAGCATCTTTG R : CAAAGATGCTTTGGATTTATTCACCCATGACGACTGTGC	C 1030 C 1031	183
ATIP3delCN	SDM	F : GGGCTCTGCTTCAAAAACAACGTCTGGTAATGCCGCTGTC R : GACAGCGGCATTACCAGACGTTGTTTTTGAAGCAGAGCCC	C 928 C 929	3474
ATIP3delCC1	SDM	F : AGCTGAGCACTTACAGCAACAATGGTCCTTCGAGA R : TCTCGAAGGACCATTGTTGCTGTAAGTGCTCAGCT	C 724 C 725	3654
ATIP3delCC2	SDM	F : GATGAAAACCTCCAAAAGTTGAAAAGAGCAGGCAAAAG R : CTTTTCCTGCTCTTTTCAACTTTTGAGGAGTTTTTCATC	C 91 C 92	3789
ATIP3delCTer	SDM	F : CCGCTCGAGCCATGACTGATGATAATTCAGATG R : CGGGGTACCTCAACACAGGTCCCCATTGTGCAG	C 70 C 209	3721
SANP	SDM	F : CCCACATCCTCCGCCAACCCCTTTCAGTCACCAAGGAATTCG R : CGAATTCCTTGGTGACTGCAAAGGGTTGGCGGAGGATGTGGG	C660 C661	3813
SAIA	SDM	F : CCCACATCCTCCGCCATCGCTTTCAGTCACCAAGGAATTCG R : CGAATTCCTTGGTGACTGCAAAGCGATGGCGGAGGATGTGGG	C662 C663	3813
D2delCN	SDM	F : GGGCTCTGCTTCAAAAACAACGTCTGGTAATGCCGCTGTC R : GACAGCGGCATTACCAGACGTTGTTTTTGAAGCAGAGCCC	C 928 C 929	1059
D2delCC1	SDM	F : AGCTGAGCACTTACAGCAACAATGGTCCTTCGAGA R : TCTCGAAGGACCATTGTTGCTGTAAGTGCTCAGCT	C 724 C 725	1239

PCR : Polymerase Chain Reaction (subcloning) ; SDM : site-directed mutagenesis ; F : Forward ; R : Reverse

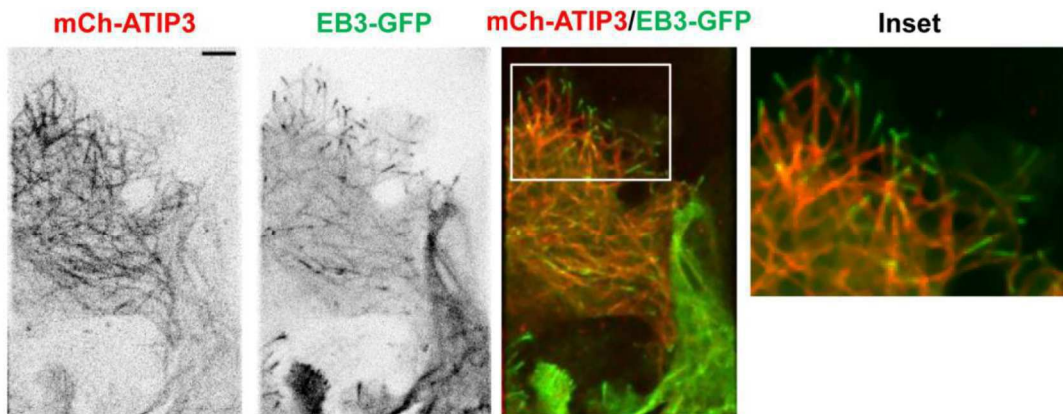


Supplementary Figure S1. ATIP3 interacts with EB1

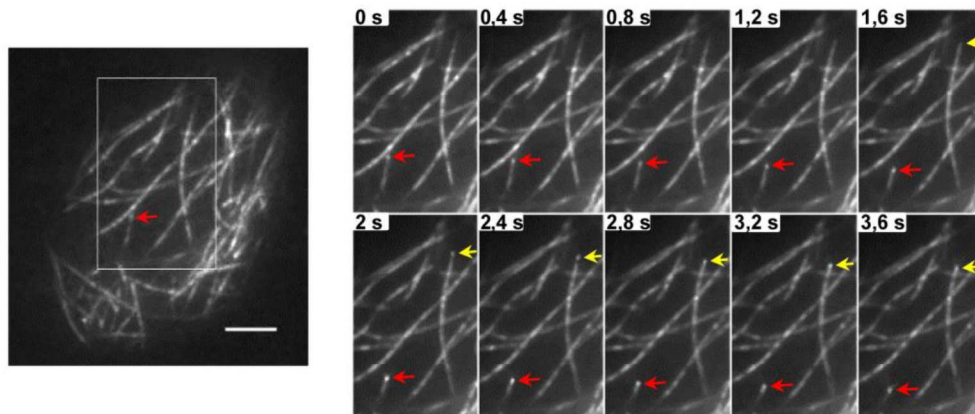


- (A).** Co-immunoprecipitation of mCh-ATIP3 with EB1-GFP, EB3-GFP and GFP-EB3 using anti-GFP antibodies. MCF7 cells were transiently transfected with mCh-ATIP3 or mCh plasmids in the presence of EB1-GFP, GFP-EB3, EB3-GFP or GFP as indicated. Western blots were probed with anti-MTUS1 and anti-GFP antibodies to reveal mCh-ATIP3 (210 KDa) and EB1/3-GFP (55 KDa), respectively.
- (B).** Amino acid sequence of the C-Terminal portion of ATIP3. The SAIP motif (residues 1249-1252, in blue) is boxed. Basic residues are shown in red. Amino acid numbering is from Accession number NP\_001001924.
- (C).** GST pull-down analysis showing precipitation of GFP-ATIP3 mutants using purified GST-EB1 agarose beads. Blots were probed with anti-GFP antibodies.
- (D).** GST pull-down assays of GFP-D2 expressed in MCF7 cells using purified GST-EB1 and deletants GST-EB1-C, GST-EB1-N and GST-EB1- $\Delta$ Ac as indicated. Blots were probed with anti-GFP antibodies.
- (E).** GST pull-down analysis showing precipitation of GFP-ATIP3 and GFP-D2 mutants as indicated, using purified GST-EB1 agarose beads. Blots were probed with anti-GFP antibodies.
- (E).** Amino acid sequence alignment of the CN45 polypeptide with ATIP3-related sequences from different species. The proline-rich motif is boxed. Stars indicate conserved residues. Hs, Homo sapiens, Bt, Bos taurus, Rn, Rattus norvegicus, Mm, Mus musculus.

**A**



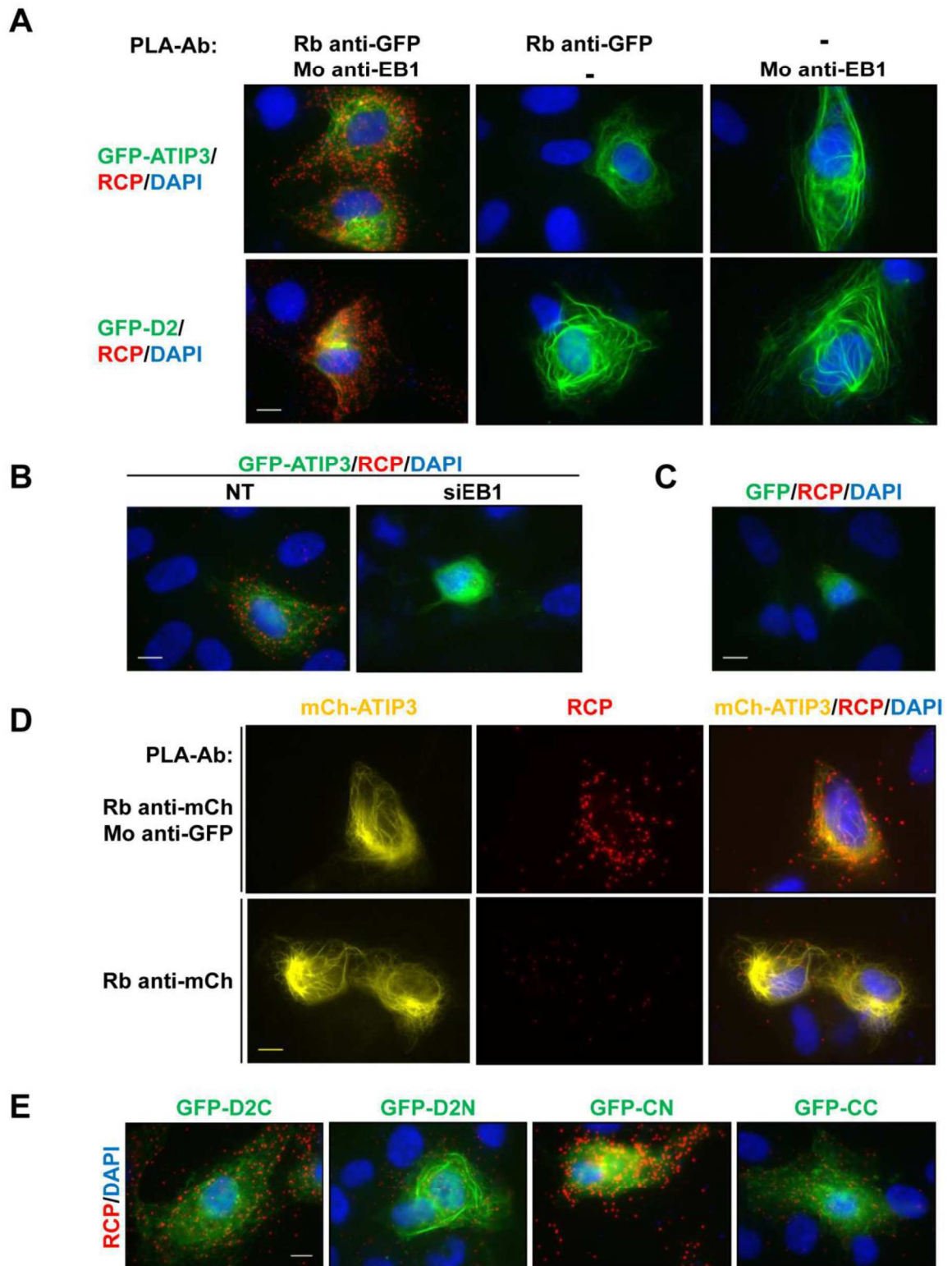
**B**



**Supplementary Figure S2. ATIP3 is not a +TIP**

(A). Images from fluorescent microscopy of SV-MRC5 living cells co-transfected with mCh-ATIP3 and EB3-GFP. Note that EB3 is enriched at the plus ends and weakly stains the MT lattice. Inset shows that mCh-ATIP3 is along the MT lattice and does not accumulate with EB3 at the plus ends.

(B). Time-lapse images of HC-7 cells (MCF7 stably expressing GFP-ATIP3 at endogenous levels). GFP-ATIP3 stains the MT lattice and the ends of shrinking MTs (arrows) in living cells, indicating backtracking properties. Scale bar, 10 $\mu$ m.



**Supplementary Figure S3. *In situ* ATIP3/EB1 molecular complexes**

(A). PLA performed in RPE-1 cells transfected with GFP-ATIP3 or GFP-D2 as indicated. Molecular complexes were analyzed using rabbit (Rb) anti-GFP and mouse (Mo) anti-EB1 primary antibodies as indicated, and corresponding secondary PLA antibodies. Rabbit anti-GFP or mouse

anti-EB1 primary antibodies alone were used as negative control. *In situ* molecular interaction is revealed by red bright signals of rolling circle amplification products (RCP) stained with cy5-labeled oligonucleotide probe. Shown are merge pictures of GFP (green), RCP (red) and nuclei (DAPI, blue) staining.

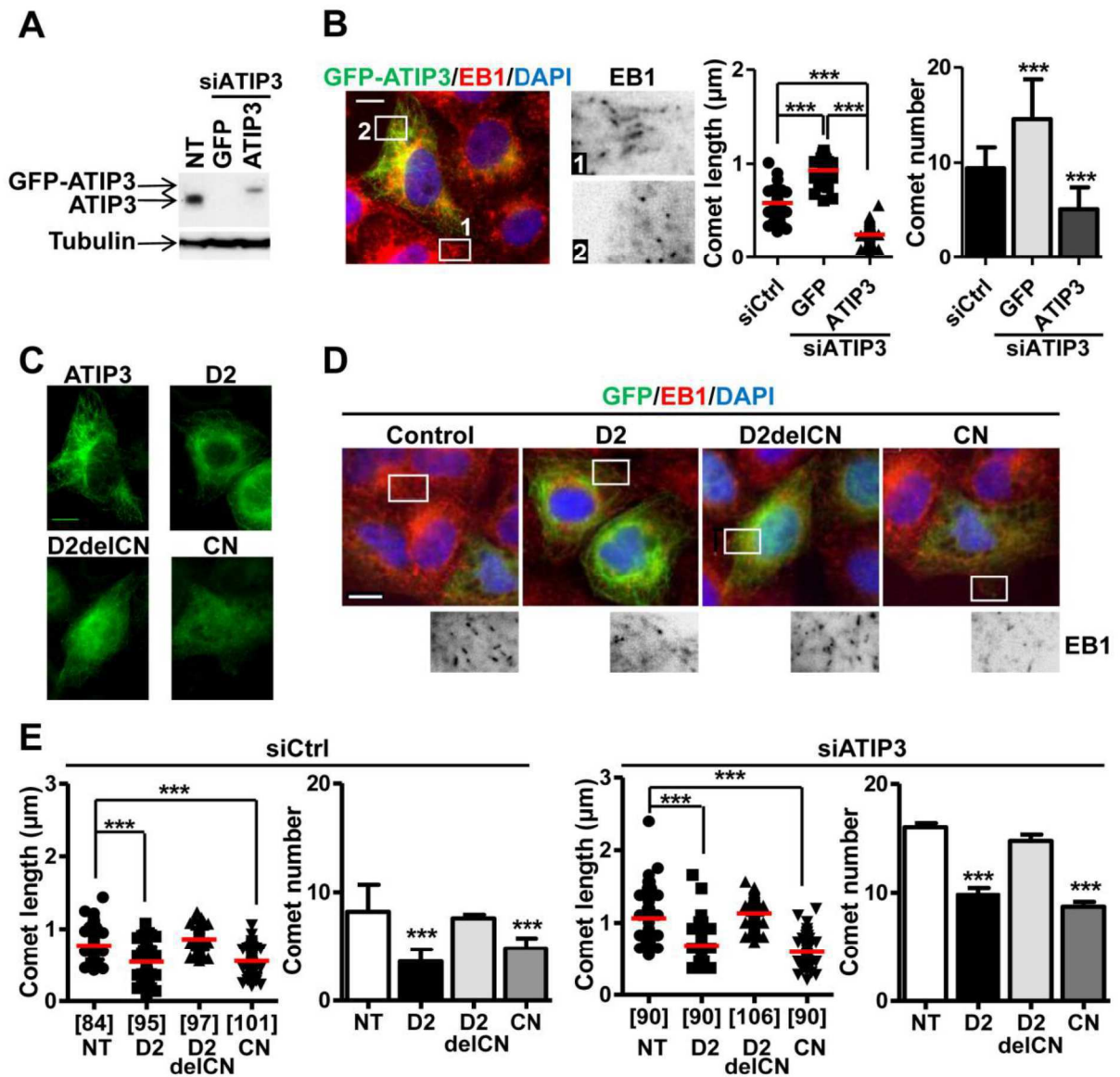
**(B).** PLA performed in RPE-1 cells transfected with GFP-ATIP3 in the presence or not of EB1-specific siRNA as indicated above. Shown are merge pictures as in (A).

**(C).** PLA performed in RPE-1 cells transfected with GFP and analyzed as in (A).

**(D).** PLA performed in RPE-1 cells stably expressing EB1-GFP and transfected with mCh-ATIP3. Molecular complexes were analyzed using rabbit (Rb) anti-mCh and mouse (Mo) anti-GFP primary antibodies and corresponding secondary PLA antibodies. Rabbit anti-mCh antibodies alone were used as negative control. *In situ* molecular interaction is revealed by red bright signals of rolling circle amplification products (RCP) stained with cy5-labeled oligonucleotide probe. Shown are merge pictures of mCh (yellow), RCP (red) and nuclei (DAPI, blue) staining.

**(E).** PLA performed in RPE-1 cells transfected with GFP-D2C, D2N, CN and CC constructs and analyzed as in (A). Shown are merge pictures as in (A).

**(A-E).** Magnification x100. Scale bar 10  $\mu$ m.



#### Supplementary Figure S4. Rescue of ATIP3-silenced phenotype

(A). Western blot analysis comparing endogenous ATIP3 and GFP-ATIP3 expression levels. HeLa cells were either left non-transfected (NT), or transfected for 72h with ATIP3-specific siRNA (siATIP3) and for 24h with plasmids encoding GFP (0.5  $\mu\text{g}$ ) or GFP-ATIP3 (2  $\mu\text{g}$ ) as indicated. Blots were probed with anti-MTUS1 antibodies to reveal endogenous ATIP3 (180 KDa) and transfected GFP-ATIP3 (210 KDa), and then reprobbed with anti-tubulin antibodies for internal control.

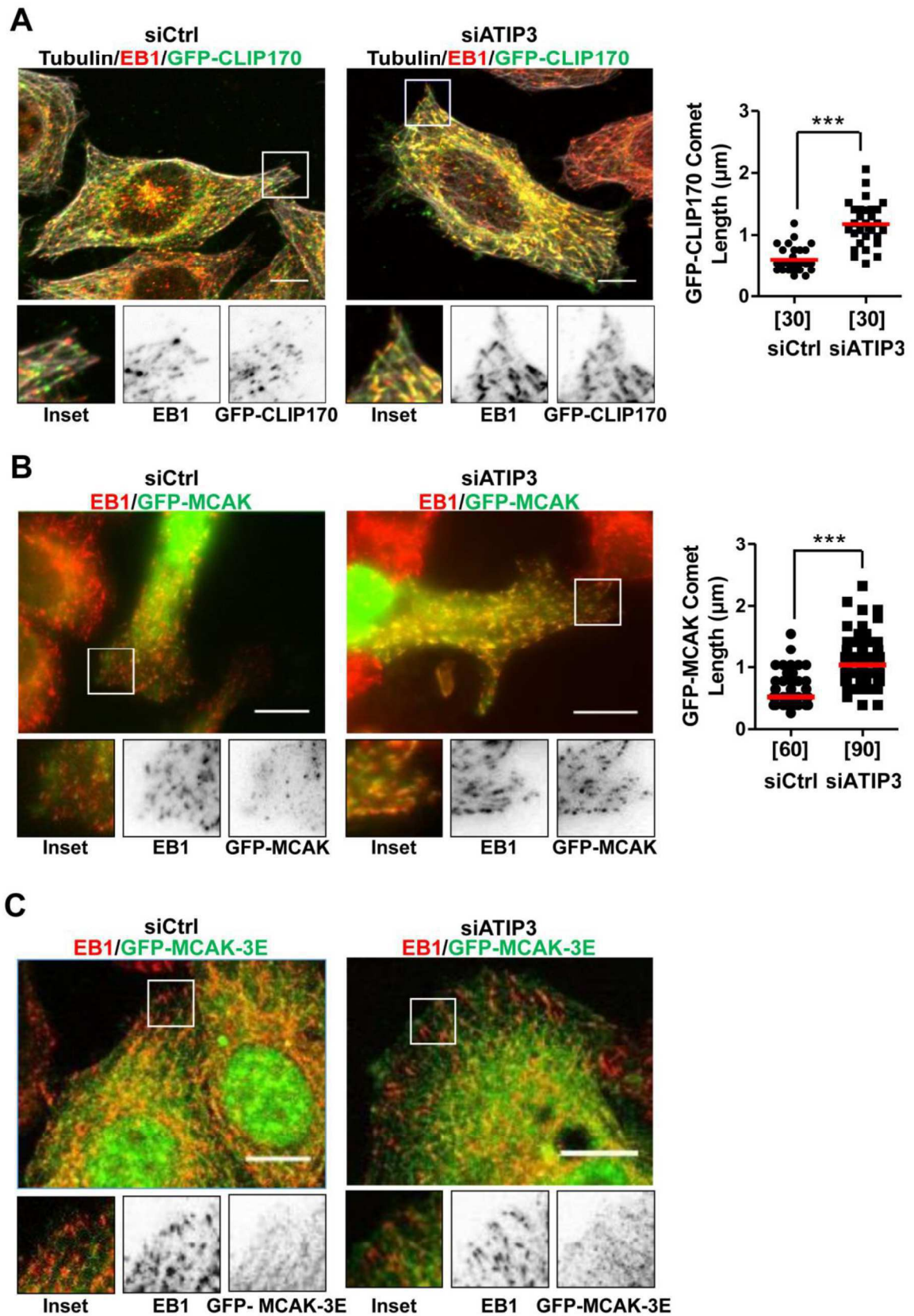
**(B).** ATIP3-silenced HeLa cells were transfected with GFP-ATIP3 plasmid (2  $\mu\text{g}$ ) as in (A), and staining with anti-GFP (green), anti-EB1 (red) and DAPI (blue) was performed. Insets show EB1 comet-like structures in enlarged portions of selected areas (insets 1 and 2 show non-transfected and transfected cells, respectively). Right panel: Quantification of comet length (scattered dot plot) and number of comets (per  $62\mu\text{m}^2$  area). For each condition, fifty comets were analyzed from 5 to 6 single cells, in 3 independent experiments. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

**(C).** ATIP3-silenced HeLa cells were transfected with GFP-ATIP3 (2  $\mu\text{g}$ ), GFP-D2 (2  $\mu\text{g}$ ), GFP-D2delCN (1  $\mu\text{g}$ ) or GFP-CN (0.5  $\mu\text{g}$ ) as indicated. Fluorescence intensity of GFP immunostaining indicates similar levels of expression for all fusion proteins.

**(D).** ATIP3-silenced HeLa cells were transfected for 24h with indicated domains in conditions of moderate expression as shown in (C). Staining with anti-GFP (green), anti-EB1 (red) and DAPI (blue) was performed. Insets (below) show EB1 accumulation at the MT plus-end in enlarged portions of selected areas.

**(E).** Quantification of comet length (scattered dot plot) and number of comets (per  $62\mu\text{m}^2$  area) in HeLa cells transfected with control siRNA (siCtrl) (left) or ATIP3-specific siRNA (siATIP3) (right panel) then transfected with GFP fusion proteins at levels close to endogenous as in (C). Quantification is from 5 to 6 single cells in 3 independent experiments. Number of comets analyzed is under brackets. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

**(B-D).** Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .



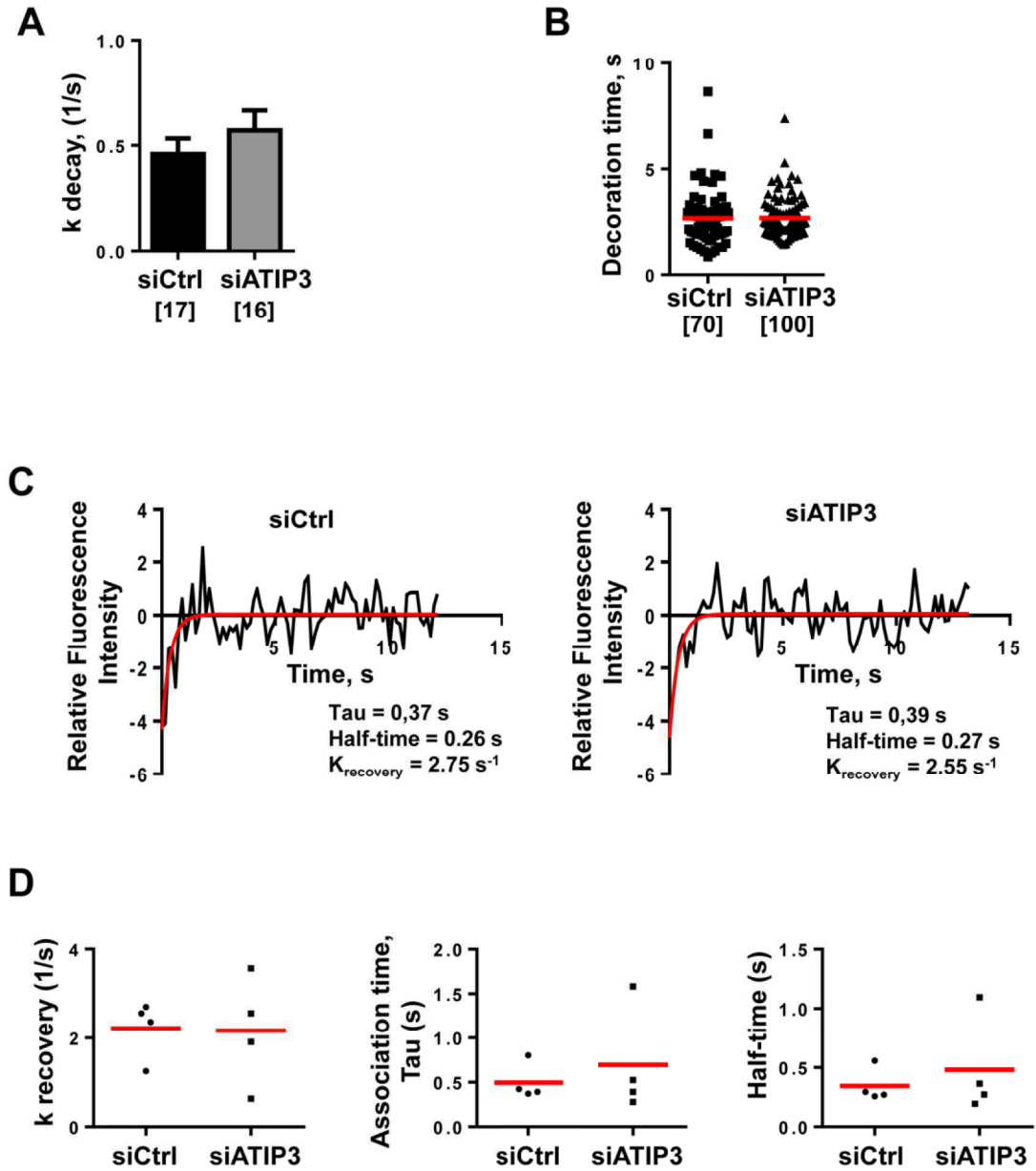
Supplementary Figure S5. ATIP3 silencing increases accumulation of CLIP-170 and MCAK together with EB1 at growing MT ends

**(A).** HeLa cells were transfected for 72h with control (siCtrl) or ATIP3-specific siRNA (siATIP3) and for 24h with GFP-CLIP-170 construct, then fixed and stained with anti-GFP (green), anti-EB1 (red) and anti-alpha-tubulin (grey). Insets show GFP-CLIP170 and EB1 comet-like structures in enlarged portions of selected areas. Scale bar: 10  $\mu$ m. Quantification of GFP-CLIP-170 comets in control and ATIP3-silenced cells is shown on the right. Comets were analyzed from 5 single cells in 2 independent experiments. Number of comets analyzed is under brackets. \*\*\* $p < 0.0001$  .

**(B).** HeLa cells were transfected for 72h with control (siCtrl) or ATIP3-specific siRNA (siATIP3) and for 24h with GFP-MCAK construct, then fixed and stained with anti-GFP (green) and anti-EB1 (red). Insets show GFP-MCAK and EB1 comet-like structures in enlarged portions of selected areas. Scale bar: 10  $\mu$ m. Right panel Quantification of GFP-MCAK comets as in (A). \*\*\* $p < 0.0001$ .

**(C).** HeLa cells were transfected for 72h with control (siCtrl) or ATIP3-specific siRNA (siATIP3) and for 24h with construct encoding mutant MCAK-3E that does not bind EB1, then processed as in (B).





**Supplementary Figure S6. EB1-GFP fluorescence decay, decoration time and EB1-GFP fluorescence recovery in the cytosol are not modified upon ATIP3 depletion**

(A). Quantification of  $k_{\text{decay}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) of EB1-GFP fluorescence decay measured by FRAP analysis in control (siCtrl, n=17) and ATIP3-depleted (siATIP3, n=16) cells, from 2 independent experiments. Number of EB1-GFP comets analyzed is under brackets.

(B). Quantification of EB1 decoration time (s) calculated as the ratio of comet length to microtubule growth rate. Time-lapse TIRF videomicroscopy analysis of HeLa cells co-transfected with siRNAs (control (siCtrl) or ATIP3-specific (siATIP3)) and EB1-GFP is described in Molina et

al. [17]. Quantification was performed on 10 cells (siCtrl) and 7 cells (siATIP3) from 2 independent experiments. Number of EB1-GFP comets analyzed is under brackets.

(C). Representative fluorescence recovery curves (in red) after photobleaching EB1-GFP in selected areas of the cytosol of control (siCtrl) and ATIP3-depleted (siATIP3) HeLa cells.

(D). Quantification of  $k_{\text{recovery}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ), association time Tau in seconds (s) and half-time of recovery in seconds (s), of EB1-GFP fluorescence recovery in the cytosol of control and ATIP3-depleted cells. For each condition, 4 bleached areas were analyzed from 4 single cells in 2 independent experiments.

## **Legends to Supplementary Movies**

### **Supplementary Movie 1. Time-lapse microscopy of SV-MRC5 cells co-transfected with mCh-ATIP3 (red) and EB3-GFP (green).**

EB3-GFP (left) and mCh-ATIP3 (right) MRC5-SV-coexpressing cells were imaged by spinning disk confocal microscopy (60X lens). Time-lapse series of 100 images were acquired in a stream mode and shown at 15 frames per second.

### **Supplementary Movie 2. Time-lapse microscopy of SV-MRC5 cells co-transfected with mCh-ATIP3 (red) and EB3-GFP (green). Inset.**

mCh-ATIP3 (red) and EB3-GFP (green) MRC5-SV-coexpressing cells were imaged by spinning disk confocal microscopy as for Supplementary Movie 1. A denoised zone of 1900  $\mu\text{m}^2$  at the cell periphery is shown.

### **Supplementary Movie 3. Time-lapse microscopy of HC-7 cells stably expressing moderate levels of GFP-ATIP3.**

Stably transfected GFP-ATIP3 cells were analyzed by time-lapse TIRF microscopy (100X lens). Time-lapse series of 500 images were acquired in a stream mode and shown at 30 frames per second.

### **Supplementary Movie 4. Time-lapse videomicroscopy of EB1-GFP fluorescent recovery after photobleaching in control and siRNA-silenced HeLa cells.**

HeLa cells were co-transfected with EB1-GFP and siRNA (control (siCtrl) or ATIP3-specific (siATIP3)) for 24h and 72h, respectively. EB1-GFP fluorescence recovery following photobleaching was analyzed by Spinning disk microscopy (100X lens). Red arrowhead indicates bleached comet. Time-lapse series of 105 images were acquired with a 150 ms interval and shown at 2 frames per second.

2. ARTICLE 2:

**Regulation of end-binding protein EB1 in the control of  
microtubule dynamics**

Nehlig A, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, Honoré S, Nahmias C  
(Cellular and Molecular Life Sciences, 2017)

Cette revue, publiée dans Cellular and Molecular Life Sciences en 2017, résume les études récentes montrant que l'association d'EB1 à l'extrémité croissante des MTs est régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation et détyrosination) et est sensible aux agents ciblant les MTs (MTAs). Les découvertes récentes montrant que des MAPs structurales (MAP1B, tau/MAP2 et ATIP3) qui n'ont pas d'activité de +TIP, interagissent avec EB1 pour empêcher son accumulation au bout plus, font également l'objet de cette revue. Ces études soulignent un nouveau concept d'antagonistes endogènes d'EB1 et mettent en avant l'importance d'une régulation fine des fonctions d'EB1 à l'extrémité croissante des MTs.

## **Regulation of End binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics**

Anne NEHLIG<sup>1,2</sup>, Angie MOLINA<sup>1,2,3</sup>, Sylvie RODRIGUES-FERREIRA<sup>1,2</sup>, Stéphane HONORE<sup>4,5</sup>, Clara NAHMIA<sup>1,2#</sup>

1. Inserm U981, Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, FRANCE
2. University Paris Saclay, 94800 Villejuif, FRANCE
3. Present address : CBD, University of Toulouse-3, FRANCE
4. Aix Marseille Univ, Inserm U-911, CRO2, Marseille, FRANCE
5. Service Pharmacie, CHU Hôpital de La Timone, APHM, Marseille, FRANCE

# corresponding author : Inserm U981, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant 94800 Villejuif, France. E-mail : clara.nahmias@inserm.fr

**Running title** : Regulation of EB1 at growing microtubule ends

**Keywords**: EB1; EB3; +TIP; microtubule-targeting agents; MAPs; phosphorylation

### **Abbreviations**

APC : Adenomatous polyposis coli

ATIP : AT2 receptors interacting protein

CAP-Gly : Cytoskeletal-associated protein glycine-rich

Cdk : Cyclin-dependent kinase

CH : Calponin homology

CLIP : Cytoplasmic linker protein

DDA3 : Differential display activated by p53

EB : End-Binding protein

EBH : End-binding homology

GDP : Guanosine diphosphate  
GSK3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase 3 beta  
GTP : Guanosine triphosphate  
KIF2A : Kinesin Heavy Chain Member 2A  
MAP : Microtubule-associated protein  
MAPRE : Microtubule-associated protein RP/EB  
MCAK : Mitotic centromere-associated kinesin  
MT : Microtubule  
MTA : Microtubule-targeting agent  
NMDA : N-Methyl-D-aspartate  
PCAF : P300/CBP-associated factor  
Pi : Inorganic phosphate  
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase  
PP2A : Protein phosphatase 2  
ROS : Reactive Oxygen Species  
SxIP : Serine-any amino acid-isoleucine-proline  
+TIP : Microtubule plus-end tracking protein  
TTBK : Tau-tubulin kinase

## **Abstract**

The regulation of microtubule dynamics is critical to ensure essential cell functions such as proper segregation of chromosomes during mitosis or cell polarity and migration. End binding protein 1 (EB1) is a plus-end tracking protein (+TIP) that accumulates at growing microtubule ends and plays a pivotal role in the regulation of microtubule dynamics. EB1 autonomously binds an extended tubulin-GTP/GDP-Pi structure at growing microtubule ends and acts as a molecular scaffold that recruits a large number of regulatory +TIPs through interaction with CAP-Gly or SxIP motifs. While extensive studies have focused on the structure of EB1-interacting site at microtubule ends and its role as a molecular platform, the mechanisms involved in the negative regulation of EB1 have only started to emerge and remain poorly understood.

In this review, we summarize recent studies showing that EB1 association with MT ends is regulated by post-translational modifications and affected by microtubule-targeting agents. We also present recent findings that structural MAPs, that have no tip-tracking activity, physically interact with EB1 to prevent its accumulation at microtubule plus ends. These observations point out a novel concept of “endogenous EB1 antagonists” and emphasize the importance of finely regulating EB1 function at growing microtubule ends.



## **Introduction**

The microtubule (MT) cytoskeleton is involved in essential cellular functions such as intracellular transport, maintenance of cell shape, polarity, cell signaling and mitosis. MTs are assembled by polymerization of  $\alpha$ -/ $\beta$ -tubulin heterodimers that are organized head-to-tail to form 13 protofilaments. Each tubulin dimer has two GTP binding sites. The  $\alpha$ -tubulin monomer contains a non-exchangeable site always filled with GTP whereas the  $\beta$ -tubulin monomer has an exchangeable site which is exposed at the dimer surface and can bind GTP, its hydrolyzed form GDP-Pi, or GDP alone when the Pi is released [1]. MT filaments are polarized with a minus end that exposes  $\alpha$ -tubulin and a plus end that exposes  $\beta$ -tubulin. MT plus ends have been extensively characterized over the past few years whereas the organization and regulation of MT minus ends have only recently started to be understood [2].

MT ends undergo continuous cycles of polymerization (growth) and depolymerization (shrinkage), with periods of pauses, a process referred to as “dynamic instability” [3]. The transition between MT growth and shrinkage is defined as catastrophe, and a rescue defines the switch from shortening to growth [4, 5]. MT dynamic instability is intrinsically driven by hydrolysis of  $\beta$ -tubulin-bound GTP, which occurs with a delay after a tubulin dimer has been incorporated into the sheet-like structure of growing microtubule ends [6]. Due to the delay in GTP hydrolysis, a cap of GTP-tubulin (GTP-cap) is formed at the end of growing MTs and is believed to protect the MT from depolymerization. A catastrophe occurs once the GTP-cap disappears and GDP-tubulin is exposed at the end of the MT [3]. This so-called “GTP-cap model” is a standard to explain MT dynamic instability [4, 5], and has been challenged by several groups over the past few years [7-10].

Dynamic instability is essential to MT functions including exploration of the cytosol, connection with various cellular components and segregation of chromosomes towards cell poles during mitosis. This process is finely controlled by a large number of regulatory MT-associated proteins (MAPs) that interact with tubulin or MTs. Among these, MT-plus-end tracking proteins (+TIPs) constitute a family of structurally and functionally diverse MT regulators that accumulate at growing plus ends and are in a privileged position to control the fate of MT tips [6]. The End-Binding protein EB1 is a +TIP that has the intrinsic ability to bind growing MT ends and recruit networks of

interacting +TIP partners. Due to its pivotal role in regulating MT dynamics at the plus ends, EB1 has been the subject of extensive studies.

This review summarizes recent insights into the structural basis of EB1 binding at growing MT ends and interaction with other +TIPs, as well as its regulation by post-translational modifications and microtubule-targeting agents (MTAs). We also present recent findings that EB1 localization at growing MT ends is negatively regulated by direct interaction with different structural MAPs that do not localize at MT ends. Relevance of these studies in human disease is discussed.

### **A family of End Binding (EB) proteins**

EB1 was first discovered in 1995 as an Adenomatous Polyposis Coli (APC)-interacting partner [11] and is now recognized as the leading member of a family of End Binding (EB) proteins, namely EB1, EB2/RP1 and EB3, encoded by evolutionarily conserved genes designated MAPRE1, MAPRE2 and MAPRE3, respectively [12]. EBs are proteins of approximately 300 amino acid residues organized into an N-terminal calponin homology (CH) domain involved in MT binding, a flexible and unstructured linker region, and a C-terminal coiled-coil domain responsible for dimerization (Figure 1). The coiled-coil domain overlaps with a unique motif, referred to as end-binding homology (EBH) domain, implicated in self-inhibition and interaction with binding partners, that ends with a flexible acidic tail containing the C-terminal sequence EEY/F [6].

EB1, EB2 and EB3 show high amino-acid sequence conservation and are ubiquitous, EB1 being highly expressed in most tissues and EB3 being particularly abundant in the brain and skeletal muscle [13]. EB1 and EB3 are generally considered equivalent in their ability to track MT ends and they form homo- and heterodimers in the cytosol [14-16]. In contrast, EB2 is less potent in binding MT ends and +TIPs, and does not heterodimerize with EB1 and EB3 [14, 15, 17]. Most analyses of EBs structure and function have focused on EB1 and its yeast homologs (Mal3 and Bim1) whereas EB3 has been mainly studied in neurons. EB2 remains poorly characterized.

### **A high-affinity, GTP-dependent EB binding site at growing MT ends**

During MT growth episodes, EB1 and EB3 accumulate at the tip of growing MTs and form “comet-like” structures that disappear during pauses and MT shrinkage. This particular feature has been largely exploited for studying MT dynamics using GFP-

tagged EB1 and EB3 as surrogate markers of MT growth [18-20]. The intriguing property of EBs to track MT ends has launched a number of studies that aimed at investigating the structural basis of EB binding sites at growing ends. *In vitro* reconstitution experiments using purified proteins indicated that EBs bind autonomously an extended region at the end of dynamic MTs [21, 22] with more than 10-fold higher affinity compared to the MT lattice [23]. EB1 turns over rapidly at its binding region on the MT end both *in vitro* and *in vivo* [22, 24] and this rapid exchange implies that free EB1 diffusion in the cytosol is a requisite and a rate-limiting step for binding to MT plus ends. Importantly, EB proteins recognize a transient, GTP/GDP-Pi-dependent conformation at the MT end [25] (Figure 2). High resolution analyses revealed that the CH domain of EB1 binds at the corner of four tubulin dimers present in two adjacent protofilaments [26, 27], which makes it ideally positioned to sense MT conformational changes induced by GTP hydrolysis. EBs do not bind to the extreme end of MT ends at which GTP is loaded, but rather bind an extended region corresponding to transient intermediate states generated during GTP hydrolysis. Recent studies further revealed that EB1 interacts with the outer surface of curved and straight tubulin sheets as well as with closed regions of the microtubule lattice [28]. The initial observation that EB binding is lost a few seconds before catastrophe suggested that the EB protein binding site may protect the MT from depolymerization [26]. Further studies [10] indicated that the EB binding region may indeed correspond to the stabilizing cap, whose length depends on MT growth rate and GTP hydrolysis, and revealed that catastrophe occurs when the number of EB binding sites at the MT end are reduced to 15-30% of their initial level [10].

Notably, EB1 not only binds the nucleotide-sensitive cap at the MT end, but also contributes to its maturation. Paradoxically, EB1 accelerates a conformational transition leading to MT catastrophe by shortening the life-time of its own protective binding site at the MT plus end [29], a finding that corroborates previous observations that EB1 increases catastrophe frequency *in vitro* [14, 21, 29-32]. Together these studies point to EB1 both as a surrogate marker of MT growth and a crucial regulator of the stabilizing cap, and thus of MT dynamic instability. In living cells however, EB1 more likely induces persistent MT growth [14] suggesting that the pro-catastrophe effect of EB1 is inhibited. This highlights the complex regulatory roles of EBs on MT dynamics in a cellular context. Post-translational modifications of EBs, as well as local modifications of EBs expression

levels, stability, conformation and/or free diffusion in the cytosol, are thus expected to promote important changes in MT plus end dynamics.

### **EB1 at the core of +TIP interacting networks**

Through its C-terminal part, EB1 interacts with numerous partners and recruits them at growing MT ends to form +TIP molecular networks that contribute to the regulation of MT dynamic instability [33-35]. EB1 partners at the MT plus ends include two major families of proteins, the CAP-Gly and the SxIP-containing proteins. Cytoskeleton-Associated Protein Glycine-rich (CAP-Gly) proteins, including CLIP-115, CLIP-170 and the dynactin complex p150<sup>glued</sup>, contain CAP-Gly domains that mediate their interaction with microtubules and EB proteins. CAP-Gly domains contain a unique hydrophobic cavity that encompasses the highly conserved GKNDG sequence motif and several characteristic Glycine residues [6, 33]. SxIP-containing proteins constitute a large family of EB1 partners characterized by the presence of one or several copies of a Ser/Thr-X-Ile-Pro (serine/threonine-any aminoacid-isoleucine-proline) motif embedded in an unstructured polypeptide region enriched in serine, proline and basic residues [36, 37]. EB1-interacting SxIP-containing proteins are structurally heterogeneous and control different aspects of MT dynamics and function [17, 38], including the regulation of catastrophes or rescues. They also provide a link between MT ends and other cellular components such as the plasma membrane, the endoplasmic reticulum, actin fibers or the kinetochores. Different sets of SxIP-containing proteins were found to interact with EB1 in interphase and at different stages of mitosis, highlighting the importance of temporal changes in EB1 interactome to ensure normal cell division [38].

Global quantification of protein expression conducted in human cell lines [39-41] revealed that EB1 is significantly more abundant than any of its +TIP partners, which suggests that multiple proteins may be recruited to MT ends simultaneously through binding to EB1 [42]. The organization of complex +TIP networks involves both hierarchical and non-hierarchical interactions with EB1 and depends on cooperation [43, 44] or competition [45] between different +TIPs for EB1 binding. The organization of dynamic +TIP networks is also orchestrated by phosphorylation of SxIP-containing proteins. Indeed, regions flanking the SxIP sequence contain positively charged residues that contribute to stabilizing the interaction with surface-exposed acidic residues of the EBH domain [36, 37], which explains why the addition of local negative charges by

phosphorylation of serine/threonine residues at the vicinity of the SxIP motif leads to loss of EB1-binding and tip-tracking property. Phosphorylation by various kinases, including GSK3 $\beta$  and mitotic kinases, appears as a major mechanism for spatio-temporal regulation of SxIP proteins at growing MT ends, with subsequent consequences on MT dynamics [33-37].

### **EB1 regulation by post-translational modifications**

A growing body of evidence indicates that EBs themselves are the targets of post-translational modifications including phosphorylation, acetylation and detyrosination (Figure 1, Table 1).

Serine and threonine residues in the flexible linker region of EBs are major sites of phosphorylation during mitosis. In yeast, EB1 homologues Bim1 and Mal3 are phosphorylated on a cluster of six serine residues in the linker region (Figure 1) and this promotes their dissociation from MTs [46, 47]. The Aurora kinase homolog Ipl1 was shown to phosphorylate Bim1 on these sites during anaphase to regulate spindle MT dynamics and spindle midzone disassembly [46]. In humans, Aurora A and Aurora B phosphorylate EB3 on S176 during early and late stages of mitosis, respectively [48]. Aurora B-mediated phosphorylation of EB3 on S176 both stabilizes EB3 during mitosis by protecting it from degradation by the proteasome [48] and allows coordination of cell adhesion with cytokinesis [49]. Recent studies indicate that EB2 is also phosphorylated on 6 clustered serine/threonine residues in the linker region by mitotic kinases Aurora B and cdk1 during mitosis, which results in loss of EB2 association with MTs and ensures proper kinetochore MT dynamics and chromosome segregation [50]. Of note, EB1 interacts with Auroras both in cells and *in vitro* but is not a substrate for these kinases [48, 51]. EB1 rather enhances Aurora B kinase activity by blocking its interaction with protein phosphatase PP2A, thereby preventing subsequent Aurora kinase inactivation [51].

The Akt/GSK3 $\beta$  pathway is another major signaling pathway that induces EB1 phosphorylation on residues S155 and T166 located in the linker region [52]. Interestingly, phosphorylation at these two sites has opposite effects on EB1. Phosphorylation on S155 contributes to EB1 accumulation at growing MT ends by increasing the life-time or number of EB1 binding sites, resulting in increased cell migration and proliferation [52]. Such post-translational modification may potentially

contribute to inhibiting the effect of EB1 on GTP/GDP-Pi maturation. In contrast, T166 phosphorylation leads to a decrease in the life-time of EB1 binding sites at MT plus ends, thus reducing EB1 comet length. As will be discussed below, the cytotoxic and anti-migratory effects of MT-targeting agents (MTAs) are sensitive to EB1 phosphorylation on residue T166 [52].

Recent studies [53, 54] have identified residues S40, T154 and T206, located in the CH, linker and coiled-coil region of EB1, respectively, as being phosphorylated by apoptosis signal-regulated kinase (ASK1). Phosphorylation at these sites increases EB1 binding at the plus ends of astral microtubules, thereby regulating mitotic spindle orientation and positioning [53], and ASK1-mediated EB1 phosphorylation at S40 contributes to the recruitment of CLIP-170 and p150<sup>Glued</sup> at the plus ends of astral microtubules [54]. Another recent study indicated that tyrosine phosphorylation also contributes to the regulation of EB1 functions [55]. Src kinase was shown to interact with EB1 and to phosphorylate residues Y247 and Y268 in the EBH region and the EEY-end of the protein, respectively. EB1 phosphorylation by src at Y247, which is prominent at the centrosome and focal adhesions, reduces EB1 binding to SxIP-containing proteins APC and MCAK, leading to the promotion of cell migration through an increase in MT dynamics [55]. Of note, in endothelial cells, EB2 phosphorylation at residue S236 by the CK2 kinase has been shown to reduce cell adhesion under shear stress [56] whereas VE-cadherin-mediated phosphorylation of EB3 at S162 [57] regulates junctional integrity.

Large-scale phosphoproteomic studies [58] have identified a total of 11 putative phosphorylation sites on human EB1 (Figure 1, Table 1), most of which correspond to residues already mentioned above (52-55). Functional studies indicated that overexpression of EB1 phospho-deficient mutants at positions Y71 and T206 leads to decreased MT growth rate and growth length compared to wild type EB1 [58], suggesting that phosphorylation at these sites may be required for EB1 function on MT dynamics at growing ends. Interestingly, a phospho-mimic mutation at position T206 abrogated EB1 interaction with CLIP-170 and p150<sup>Glued</sup> but not with APC nor MCAK, and residue Y217 was found essential for EB1 tip-tracking activity, dimerization and interaction with both SxIP-containing (APC, MCAK) and CAP-Gly (CLIP-170, p150<sup>Glued</sup>) partners [58]. Further studies should be conducted to validate additional potential EB1 phosphorylation sites (S27, T33, S156, S157, S165) identified by mass spectrometry.

Other post-translational modifications, such as ubiquitination and acetylation, regulate EBs stability or functions during mitosis. EB3 interacts with the SIAH-1 E3 ligase and gets ubiquitinated and degraded by the proteasome at the end of mitosis, in an Aurora B-dependent manner [48]. Other studies have shown that EB1 is acetylated at residue K220 by P300/CBP-associated factor (PCAF acetyltransferase) in mitosis [59] (Table 1). Acetylation does not affect EB1 dimerization but impairs its interaction with several SxIP-containing +TIPs including TIP150, MCAK and DDA3 [59]. Persistent EB1 acetylation leads to aberrant metaphase alignment [59, 60] and impaired directional migration [61]. Finally, the C-terminal tail of EB1 (residues EEY) is the target of detyrosination/tyrosination cycles, similar to what was shown for tubulin. EB1 detyrosination may increase EB1 decoration time at MT plus ends and decrease MT catastrophe, thereby contributing to increased cell migration [62].

### **Reciprocal effects of MTAs and EB1**

Microtubule-targeting agents (MTAs) are a broad class of compounds that bind to tubulin and/or MTs and interfere with MT polymerization and dynamics. Due to their potent anti-cancer effects, a large number of studies have been dedicated to evaluating their mechanisms of action [63, 64]. Different MTAs bind MTs at different sites. Vinblastine binds the  $\beta$ -subunit of tubulin in a region called “vinca-binding domain” and has been shown to bind with high affinity at the extreme ends of purified MTs *in vitro* [63]. Eribulin binds another high affinity binding site on  $\beta$ -tubulin that is exposed at the plus ends of MTs [65, 66] whereas paclitaxel binds to  $\beta$ -tubulin on the inside surface of the MT, at the “taxane-binding site” [67].

MTAs are usually classified as MT polymerizing and depolymerizing compounds according to the effects they have on the MT polymer mass when used at relatively high concentrations. Taxanes (paclitaxel, docetaxel) and epothilones promote MT assembly and stabilization whereas vinca-alkaloids (vincristine, vinflunine) and eribulin depolymerize MTs. At lower concentrations that do not affect polymer mass but are still cytotoxic, MTAs of both classes suppress MT dynamic instability and behave as mitotic poisons that target the mitotic spindle, inducing mitotic arrest and apoptosis. At very low doses of the nanomolar range showing no cytotoxicity, these compounds impair cell migration and differentiation, and increase rather than suppress dynamic instability. Indeed, ultra-low doses of MTAs often increase growth and shortening rates of

interphase MTs and consistently increase catastrophe frequency (Figure 3), with a concomitant reduction [68-70] and splitting [65] of EB comets.

Recent studies revealed that in addition to their direct effect through binding to MTs, different classes of MTAs including vincristine, paclitaxel and patupilone also regulate MT dynamics by promoting GSK3 $\beta$ -mediated phosphorylation of EB1 [52] (Figure 3). These agents were shown to increase mitochondrial ROS, leading to a decrease in Akt phosphorylation and a subsequent increase in GSK3 $\beta$  activity, that in turn induces EB1 phosphorylation on S155 and T166 residues in the linker region. As mentioned above, S155 phosphorylation in cancer cells promotes EB1 accumulation at MT ends by increasing the life-time of EB1 binding sites whereas T166 phosphorylation reduces EB1 comet length by decreasing MT growth rate. Of interest, a phospho-defective mutant (T166A) of EB1 induces resistance to MTA actions [52]. In astrocytes, the PI3K- GSK3 $\beta$  signaling pathway also leads to a decrease in EB1 comet length together with decreased cell migration following exposure to HYS-32, a derivative of MT depolymerizing agent combrestatin-A4 [71]. Finally, the vinca-alkaloid compound vinflunine was shown to interfere with the EB1 tyrosination/ detyrosination cycle in endothelial and glioblastoma cells by decreasing the level of the detyrosinated form and increasing the native tyrosinated form of EB1, thereby reducing cell migration [62].

Not surprisingly, the presence of EB1 or EB3 was shown to modify the effects of MTAs on MT dynamics *in vitro*, illustrating the existence of an intrinsic mechanism of cross-regulation between MTs, EBs and drugs [69, 32]. Indeed, in the absence of EBs, MTAs more likely suppress dynamic instability parameters such as MT growth and shortening rates *in vitro* whereas in the presence of EBs, both polymerizing and depolymerizing agents strongly induce MT catastrophes even at ultra-low drug concentration [32]. Thus, EBs synergize with MTAs to increase MT catastrophes [32] (Figure 3), which is consistent with the above-mentioned contribution of EB1 to the maturation of MT ends *in vitro*, but may seem counterintuitive given the opposite effects of EB1 and MTAs on cell proliferation and migration. In glioblastoma cells, the effects of vinflunine on MT dynamics, cell proliferation and migration as well as tumor growth were also sensitized by overexpression of EB1 [72]. Furthermore, EB1-overexpressing glioblastoma cancer stem cells were highly sensitive to sub-cytotoxic doses of BAL27862, a colchicine site binder, leading to inhibition of cell migration and self-renewal and promoting astrocytic differentiation, whereas EB1-silenced cancer stem cells remained unaffected [73]. In



contrast, results remain controversial in breast cancer, as EB1 has been shown either to sensitize [74] or counteract [75] the effects of paclitaxel. The discrepancy between the latter studies may relate to the pharmacological complexity of MTAs and/or to different drug concentrations used in the experiments. Indeed, the sensitizing effect of EB1 on MTAs was found to be more prevalent at low concentrations of drugs [72].

### **Negative regulation of EB1 at growing ends by structural MAPs**

While the structural basis and functional relevance of EB1 interaction with numerous +TIPs have been extensively studied in the past few years, the notion has only recently emerged that EB1 and EB3 accumulation at growing MT ends is negatively regulated by direct interaction with structural MAPs, which bind to the MT lattice and not to the end. MAP1B, a classical MAP highly expressed in developing neurons, is known to regulate neurite extension and axon growth by promoting MT polymerization and stabilization [76]. An additional layer of MT regulation by MAP1B through functional cross-talk with EBs has been described by Tortosa et al. [77] who showed that MAP1B co-localizes with EB1 and EB3 in growth cones where it locally impairs EB1 and EB3 accumulation at the MT plus ends. Direct interaction between MAP1B and EBs takes place in the cytosol in a MT-independent manner, and is sensitive to phosphorylation by GSK3 and cdk5 kinases. Physical EB3-MAP1B interaction lowers EB3 mobility in the cytosol, thereby reducing the « effective » concentration of EB3 available for free exchange at MT ends [77]. This in turn leads to local changes in MT dynamics, illustrated by an increase in MT growth rate, and a decrease in time-based catastrophe frequency and MT pauses, in extending neurites of MAP1B-deficient neurons. Thus, MAP1B indirectly regulates MT dynamics at growing plus ends in developing neurons by a mechanism involving cytosolic sequestration of EB proteins (Figure 4).

Tau is another major neuronal MAP that promotes MT polymerization and stabilization. Recent studies showed that tau and EBs are enriched in differentiating neuroblastoma cells and that they partially colocalize in extending neurites [78]. When expressed at high levels, tau induces MT bundling and promotes redistribution of EB1 and EB3 along MT bundles [78, 79] by a mechanism that depends on tau phosphorylation on S262 [79]. Direct interaction between tau and EBs in the cytosol leads to reduced binding of EBs at growing MT ends and antagonizes EB1 and EB3 functions [78-81]. A similar mechanism of EB3 trapping on MT bundles has been reported for MAP2-EB3 interaction upon

prolonged stimulation of NMDA receptors in hippocampal neurons [82]. Direct interaction between MAP2 and EB3, which is concomitant with NMDA-mediated MAP2 dephosphorylation, gradually recruits EB3 along MAP2-positive microtubule bundles in the dendritic shaft [82] resulting in MT stabilization, allowing synaptic plasticity.

A third mechanism of EB1 negative regulation by a structural MAP has been depicted through the studies of MT-associated tumor suppressor ATIP3 [83]. ATIP3 is a stabilizing MAP [84-87] whose silencing regulates MT dynamics by increasing MT growth rate and reducing catastrophe, which results in an increase of EB1 comet length [87]. Recent studies have shown that ATIP3 interacts directly with EB1 in a MT-independent manner, via a proline-rich motif that differs from the consensus SxIP sequence. ATIP3 does not co-localize with EB1 at growing MT ends and EB1-ATIP3 molecular complexes are mainly detected in the cytosol and along the MT lattice [83]. In contrast to other classical MAPs, ATIP3 does not modify EB1 mobility in the cytosol and therefore its effects are unlikely to involve EB1 sequestration. Interestingly, EB1-GFP fluorescence recovery measured by FRAP analyses at growing MT ends was significantly accelerated upon ATIP3 silencing, indicating that ATIP3 reduces the rate of EB1 binding/unbinding to its high-affinity binding site [83]. *In vitro* studies indicated that purified EB1-interacting domain of ATIP3 has no significant effect on EB1 binding to growing MT ends in a cell-free system, suggesting that negative regulation of EB1 by ATIP3 may involve other cellular components and/or post-translational modifications.

Together, these studies illustrate three major mechanisms by which structural MAPs directly interact with EBs in the cytosol to regulate EBs localization and function at MT plus ends (Figure 4), which does not exclude that overexpression of classical MAPs may also alter EB1 comet length through changes in MT stability and dynamics.

These novel findings lead to the interesting concept that a subset of MAPs may represent « endogenous EB1 antagonists », that are immediately available to regulate EB1 and/or EB3 in the cytosol or at the vicinity of MTs. EBs regulation by classical MAPs, either by cytosolic sequestration (MAP1B), trapping at MT bundles (tau/MAP2), or reduced turnover at MT ends (ATIP3), results in decreased accumulation of EBs and +TIPs molecular complexes at growing ends with subsequent changes in MT dynamics. Interestingly, EBs interactions with MAP1B and MAP2 are sensitive to phosphorylation, as are +TIPs/EBs complexes, raising the possibility that a functional interplay between classical MAPs and +TIPs may be orchestrated by phosphorylation.

The discovery of novel regulatory mechanisms, by which direct interaction between classical MAPs and EB1 in the cytosol modifies EB1 binding properties at the plus ends, brings an additional layer of complexity to the regulation of MT dynamics, which may take place either locally (in neurite extensions) or upon external stimulation. Given the large number of structural MAPs that are known to promote MT polymerization and stabilization in different physiological situations, it is likely that a growing number of EBs-interacting MAPs will be identified in the coming years.

### **Relevance in human pathology**

These observations are of particular relevance in pathological situations, such as cancer and neurodegenerative diseases, in which MT dynamics plays an essential role and is often dysregulated. EB1 has been found overexpressed in various cancer types, including hepatocellular carcinoma [88] and glioblastoma [72] as well as breast [89], colon [90, 91] and oral cancers [92], and stands as a prognostic biomarker whose high expression level correlates with poor survival of the patients. Given its effects on cell sensitivity to MTAs, EB1 may also represent a predictive biomarker for the response of tumors to MT-targeting chemotherapy [72, 74]. Indeed, it was recently demonstrated that high levels of EB1 expression in glioblastoma are associated with a better response to vincristine both in cells and in nude mice [72] and that breast cancer patients with high EB1 levels are better responders to paclitaxel-based chemotherapy [74]. Moreover, functional studies have uncovered mitotic and pro-migratory effects of EB1 overexpression, suggesting that EB1 may also represent a valuable therapeutic target against cancer. Deeper understanding of endogenous and drug-induced regulation of EB1 at growing MT ends, and the identification of molecular alterations of complex +TIP networks in tumor cells, will be an important step towards the design of novel efficient +TIP-targeted anti-cancer therapies. The demonstration that ATIP3, a potent MT-associated tumor suppressor in breast, colon, liver and oral cancers, interacts with EB1 to negatively regulate its turnover at MT growing ends [83], further illustrates the importance of targeting EB1 and its interactome in cancer. In this context, peptide aptamers that bind either EB1 or EB3, and interfere with MT dynamics [93] may represent an interesting option.

Fine regulation of MT dynamics is also essential to neuronal development and homeostasis, which rely on cell polarity and intracellular transport. A wide range of SxIP-containing or CAP-Gly proteins are involved in neuronal functions and were reported to be altered in neurological diseases (reviewed in [94]), suggesting that EB-interacting molecular networks may also be modified in the central nervous system in pathological situations. In addition to +TIPs, well-characterized neuronal MAPs such as MAP1B, MAP2 and tau, that play essential roles in neuronal polarity and synaptic plasticity, also directly bind EB1 and EB3 to antagonize their functions, as discussed above. Interestingly, EB1 indirectly contributes to the phosphorylation of KIF2A depolymerizing kinesin by tau-tubulin kinases TTBK2 [95], an observation that adds additional complexity to the effects of EB1 in MT dynamics regulation. Together these findings suggest that not only +TIPs or MAPs, but also protein kinases that control EBs molecular interactions, are likely to locally contribute to spatiotemporal regulation of MT dynamics and may be targeted in human diseases.

### **Concluding remarks**

Since the discovery of the EB1 protein family, extensive studies have highlighted its pivotal role both as a marker and a regulator of MT dynamic instability at growing ends. The EB1 binding site at the MT plus end has been described at high resolution, and the molecular basis for EB1 recruitment of a wide family of proteins at the plus ends has been largely documented. The apparent contradiction between EB1 effects *in vitro* (inducing catastrophe) and *in vivo* (promoting persistent growth), together with the impact of post-translational modifications of EBs and intracellular partners on MT dynamics remain to be fully addressed. Recent studies have evidenced an additional level of indirect regulation of EBs at the plus ends by structural MAPs that bind EBs in the cytosol and antagonize their functions. Given the key role of EBs molecular complexes in the control of essential MT functions, further understanding the exquisite regulation of EBs interactions may pave the way to attractive therapeutic strategies targeting the MT cytoskeleton against human diseases.

## **Acknowledgements**

Authors are supported by grants from the Institut Gustave Roussy, the Inserm, the CNRS, the Ligue contre le Cancer Comité Ile-de-France, the Association pour la Recherche contre le Cancer (Fondation ARC), the A\*MIDEX project (n°ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the “Investissements d’Avenir” French Government program, managed by the ANR and ITMO Cancer AVIESAN as part of the Cancer Plan no. PC201419, and the associations Odyssea and Prolific.

## **Competing interests**

The authors declare no competing interests

## References

1. Hyman AA, Salser S, Drechsel DN, et al (1992) Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* 3:1155–1167.
2. Akhmanova A, Steinmetz MO (2015) Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:711–726. doi: 10.1038/nrm4084
3. Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–242. doi: 10.1038/312237a0
4. Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:83–117. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83
5. Howard J, Hyman AA (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422:753–758. doi: 10.1038/nature01600
6. Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:309–322. doi: 10.1038/nrm2369
7. Seetapun D, Castle BT, McIntyre AJ, et al (2012) Estimating the Microtubule GTP Cap Size In Vivo. *Curr Biol* 22:1681–1687. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.068
8. Bowne-Anderson H, Hibbel A, Howard J (2015) Regulation of Microtubule Growth and Catastrophe: Unifying Theory and Experiment. *Trends Cell Biol* 25:769–779. doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.009
9. Piedra F-A, Kim T, Garza ES, et al (2016) GDP to GTP exchange on the microtubule end can contribute to the frequency of catastrophe. *Mol Biol Cell*. doi: 10.1091/mbc.E16-03-0199
10. Duellberg C, Cade NI, Holmes D, Surrey T (2016) The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.13470
11. Su LK, Burrell M, Hill DE, et al (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* 55:2972–2977.
12. Su L-K, Qi Y (2001) Characterization of Human MAPRE Genes and Their Proteins. *Genomics* 71:142–149. doi: 10.1006/geno.2000.6428
13. Nakagawa H, Koyama K, Murata Y, et al (2000) EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene* 19:210–216. doi: 10.1038/sj.onc.1203308
14. Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, et al (2009) Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol* 184:691–706. doi: 10.1083/jcb.200807179

15. De Groot CO, Jelesarov I, Damberger FF, et al (2010) Molecular Insights into Mammalian End-binding Protein Heterodimerization. *J Biol Chem* 285:5802–5814. doi: 10.1074/jbc.M109.068130
16. Sen I, Veprintsev D, Akhmanova A, Steinmetz MO (2013) End binding proteins are obligatory dimers. *PloS One* 8:e74448. doi: 10.1371/journal.pone.0074448
17. Jiang K, Toedt G, Montenegro Gouveia S, et al (2012) A Proteome-wide Screen for Mammalian SxIP Motif-Containing Microtubule Plus-End Tracking Proteins. *Curr Biol* 22:1800–1807. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.047
18. Piehl M (2003) Organization and Dynamics of Growing Microtubule Plus Ends during Early Mitosis. *Mol Biol Cell* 14:916–925. doi: 10.1091/mbc.E02-09-0607
19. Stepanova T, Slemmer J, Hoogenraad CC, et al (2003) Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:2655–2664.
20. Salaycik KJ (2005) Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells. *J Cell Sci* 118:4113–4122. doi: 10.1242/jcs.02531
21. Bieling P, Laan L, Schek H, et al (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* 450:1100–1105. doi: 10.1038/nature06386
22. Dixit R, Barnett B, Lazarus JE, et al (2009) Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci* 106:492–497. doi: 10.1073/pnas.0807614106
23. Maurer SP, Bieling P, Cope J, et al (2011) GTP S microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc Natl Acad Sci* 108:3988–3993. doi: 10.1073/pnas.1014758108
24. Dragestein KA, van Cappellen WA, van Haren J, et al (2008) Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *J Cell Biol* 180:729–737. doi: 10.1083/jcb.200707203
25. Zanic M, Stear JH, Hyman AA, Howard J (2009) EB1 Recognizes the Nucleotide State of Tubulin in the Microtubule Lattice. *PLoS ONE* 4:e7585. doi: 10.1371/journal.pone.0007585
26. Maurer SP, Fourniol FJ, Bohner G, et al (2012) EBs Recognize a Nucleotide-Dependent Structural Cap at Growing Microtubule Ends. *Cell* 149:371–382. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.049
27. Zhang R, Alushin GM, Brown A, Nogales E (2015) Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* 162:849–859. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.012
28. Guesdon A, Bazile F, Buey RM, et al (2016) EB1 interacts with outwardly curved and straight regions of the microtubule lattice. *Nat Cell Biol* 18:1102–1108. doi: 10.1038/ncb3412

29. Maurer SP, Cade NI, Bohner G, et al (2014) EB1 Accelerates Two Conformational Transitions Important for Microtubule Maturation and Dynamics. *Curr Biol* 24:372–384. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.042
30. Vitre B, Coquelle FM, Heichette C, et al (2008) EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat Cell Biol* 10:415–421. doi: 10.1038/ncb1703
31. Zanic M, Widlund PO, Hyman AA, Howard J (2013) Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nat Cell Biol* 15:688–693. doi: 10.1038/ncb2744
32. Mohan R, Katrukha EA, Doodhi H, et al (2013) End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents. *Proc Natl Acad Sci* 110:8900–8905. doi: 10.1073/pnas.1300395110
33. Galjart N (2010) Plus-End-Tracking Proteins and Their Interactions at Microtubule Ends. *Curr Biol* 20:R528–R537. doi: 10.1016/j.cub.2010.05.022
34. Akhmanova A, Steinmetz MO (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* 123:3415–3419. doi: 10.1242/jcs.062414
35. Kumar P, Wittmann T (2012) +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol* 22:418–428. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.005
36. Honnappa S, Gouveia SM, Weisbrich A, et al (2009) An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell* 138:366–376. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.065
37. Buey RM, Sen I, Kortt O, et al (2012) Sequence Determinants of a Microtubule Tip Localization Signal (MtLS). *J Biol Chem* 287:28227–28242. doi: 10.1074/jbc.M112.373928
38. Tamura N, Simon JE, Nayak A, et al (2015) A proteomic study of mitotic phase-specific interactors of EB1 reveals a role for SXIP-mediated protein interactions in anaphase onset. *Biol Open* 4:155–169. doi: 10.1242/bio.201410413
39. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, et al (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337–342. doi: 10.1038/nature10098
40. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, et al (2014) Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 7:548–548. doi: 10.1038/msb.2011.81
41. Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, et al (2014) The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol* 7:549–549. doi: 10.1038/msb.2011.82
42. Jiang K, Akhmanova A (2011) Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Curr Opin Cell Biol* 23:94–101. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.008
43. Jiang K, Wang J, Liu J, et al (2009) TIP150 interacts with and targets MCAK at the microtubule plus ends. *EMBO Rep* 10:857–865. doi: 10.1038/embor.2009.94



44. van der Vaart B, Manatschal C, Grigoriev I, et al (2011) SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J Cell Biol* 193:1083–1099. doi: 10.1083/jcb.201012179
45. Duellberg C, Trokter M, Jha R, et al (2014) Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein. *Nat Cell Biol* 16:804–811. doi: 10.1038/ncb2999
46. Zimniak T, Stengl K, Mechtler K, Westermann S (2009) Phosphoregulation of the budding yeast EB1 homologue Bim1p by Aurora/Ipl1p. *J Cell Biol* 186:379–391. doi: 10.1083/jcb.200901036
47. Iimori M, Ozaki K, Chikashige Y, et al (2012) A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules. *Exp Cell Res* 318:262–275. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.11.006
48. Ban R, Matsuzaki H, Akashi T, et al (2009) Mitotic Regulation of the Stability of Microtubule Plus-end Tracking Protein EB3 by Ubiquitin Ligase SIAH-1 and Aurora Mitotic Kinases. *J Biol Chem* 284:28367–28381. doi: 10.1074/jbc.M109.000273
49. Ferreira JG, Pereira AJ, Akhmanova A, Maiato H (2013) Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. *J Cell Biol* 201:709–724. doi: 10.1083/jcb.201301131
50. Iimori M, Watanabe S, Kiyonari S, et al (2016) Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nat Commun* 7:11117. doi: 10.1038/ncomms11117
51. Sun L, Gao J, Dong X, et al (2008) EB1 promotes Aurora-B kinase activity through blocking its inactivation by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci* 105:7153–7158. doi: 10.1073/pnas.0710018105
52. Le Grand M, Rovini A, Bourgarel-Rey V, et al (2014) ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3 $\beta$  pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents. *Oncotarget* 5:3408–3423.
53. Luo Y, Ran J, Xie S, et al (2016) ASK1 controls spindle orientation and positioning by phosphorylating EB1 and stabilizing astral microtubules. *Cell Discov* 2:16033. doi: 10.1038/celldisc.2016.33
54. Ran J, Luo Y, Zhang Y, et al (2016) Phosphorylation of EB1 regulates the recruitment of CLIP-170 and p150glued to the plus ends of astral microtubules. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.14222
55. Zhang Y, Luo Y, Lyu R, et al (2016) Proto-Oncogenic Src Phosphorylates EB1 to Regulate the Microtubule-Focal Adhesion Crosstalk and Stimulate Cell Migration. *Theranostics* 6:2129–2140. doi: 10.7150/thno.16356
56. Stenner F, Liewen H, Göttig S, et al (2013) RP1 is a phosphorylation target of CK2 and is involved in cell adhesion. *PloS One* 8:e67595. doi: 10.1371/journal.pone.0067595

57. Komarova YA, Huang F, Geyer M, et al (2012) VE-cadherin signaling induces EB3 phosphorylation to suppress microtubule growth and assemble adherens junctions. *Mol Cell* 48:914–925. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.011
58. Chen J, Luo Y, Li L, et al (2014) Phosphoregulation of the dimerization and functions of end-binding protein 1. *Protein Cell* 5:795–799. doi: 10.1007/s13238-014-0081-9
59. Xia P, Wang Z, Liu X, et al (2012) EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc Natl Acad Sci* 109:16564–16569. doi: 10.1073/pnas.1202639109
60. Ward T, Wang M, Liu X, et al (2013) Regulation of a Dynamic Interaction between Two Microtubule-binding Proteins, EB1 and TIP150, by the Mitotic p300/CBP-associated Factor (PCAF) Orchestrates Kinetochore Microtubule Plasticity and Chromosome Stability during Mitosis. *J Biol Chem* 288:15771–15785. doi: 10.1074/jbc.M112.448886
61. Zhang L, Shao H, Zhu T, et al (2013) DDA3 associates with microtubule plus ends and orchestrates microtubule dynamics and directional cell migration. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep01681
62. Rovini A, Gauthier G, Bergès R, et al (2013) Anti-Migratory Effect of Vinflunine in Endothelial and Glioblastoma Cells Is Associated with Changes in EB1 C-Terminal Detyrosinated/Tyrosinated Status. *PLoS ONE* 8:e65694. doi: 10.1371/journal.pone.0065694
63. Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253–265. doi: 10.1038/nrc1317
64. Dumontet C, Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9:790–803. doi: 10.1038/nrd3253
65. Doodhi H, Prota AE, Rodríguez-García R, et al (2016) Termination of Protofilament Elongation by Eribulin Induces Lattice Defects that Promote Microtubule Catastrophes. *Curr Biol* 26:1713–1721. doi: 10.1016/j.cub.2016.04.053
66. Smith JA, Wilson L, Azarenko O, et al (2010) Eribulin Binds at Microtubule Ends to a Single Site on Tubulin To Suppress Dynamic Instability. *Biochemistry (Mosc)* 49:1331–1337. doi: 10.1021/bi901810u
67. Nogales E, Wolf SG, Khan IA, et al (1995) Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 375:424–427. doi: 10.1038/375424a0
68. Pourroy B, Honore S, Pasquier E, et al (2006) Antiangiogenic Concentrations of Vinflunine Increase the Interphase Microtubule Dynamics and Decrease the Motility of Endothelial Cells. *Cancer Res* 66:3256–3263. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3885
69. Pagano A, Honoré S, Mohan R, et al (2012) Epothilone B inhibits migration of glioblastoma cells by inducing microtubule catastrophes and affecting EB1

- accumulation at microtubule plus ends. *Biochem Pharmacol* 84:432–443. doi: 10.1016/j.bcp.2012.05.010
70. O'Rourke B, Yang C-PH, Sharp D, Horwitz SB (2014) Eribulin disrupts EB1-microtubule plus-tip complex formation. *Cell Cycle* 13:3218–3221. doi: 10.4161/15384101.2014.950143
71. Chiu C-T, Liao C-K, Shen C-C, et al (2015) HYS-32-Induced Microtubule Catastrophes in Rat Astrocytes Involves the PI3K-GSK3 $\beta$  Signaling Pathway. *PLOS ONE* 10:e0126217. doi: 10.1371/journal.pone.0126217
72. Berges R, Baeza-Kalée N, Tabouret E, et al (2014) End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to Vinca-alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget* 5:12769–12787.
73. Berges R, Tchoghandjian A, Honore S, et al (2016) The novel tubulin-binding, checkpoint activator BAL101553 inhibits EB1-dependent migration and invasion and promotes differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Mol Cancer Ther.* doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0252
74. Luo Y, Li D, Ran J, et al (2014) End-binding protein 1 stimulates paclitaxel sensitivity in breast cancer by promoting its actions toward microtubule assembly and stability. *Protein Cell* 5:469–479. doi: 10.1007/s13238-014-0053-0
75. Thomas G, Sreeja J, Gireesh K, et al (2014) +TIP EB1 downregulates paclitaxel-induced proliferation inhibition and apoptosis in breast cancer cells through inhibition of paclitaxel binding on microtubules. *Int J Oncol.* doi: 10.3892/ijo.2014.2701
76. Tymanskyj SR, Scales TME, Gordon-Weeks PR (2012) MAP1B enhances microtubule assembly rates and axon extension rates in developing neurons. *Mol Cell Neurosci* 49:110–119. doi: 10.1016/j.mcn.2011.10.003
77. Tortosa E, Galjart N, Avila J, Sayas CL (2013) MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J* 32:1293–1306. doi: 10.1038/emboj.2013.76
78. Sayas CL, Tortosa E, Bollati F, et al (2015) Tau regulates the localization and function of End-binding proteins 1 and 3 in developing neuronal cells. *J Neurochem* 133:653–667. doi: 10.1111/jnc.13091
79. Ramirez-Rios S, Denarier E, Prezel E, et al (2016) Tau antagonizes end-binding protein tracking at microtubule ends through a phosphorylation-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 27:2924–2934. doi: 10.1091/mbc.E16-01-0029
80. Sayas CL, Avila J (2014) Regulation of EB1/3 proteins by classical MAPs in neurons. *Bioarchitecture* 4:1–5. doi: 10.4161/bioa.27774
81. Avila J, Pallas N, Bolós M, et al (2016) Intracellular and extracellular microtubule associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer disease and other

tauopathies. *Expert Opin Ther Targets* 20:653–661. doi: 10.1517/14728222.2016.1131269

82. Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, et al (2011) NMDA Receptor Activation Suppresses Microtubule Growth and Spine Entry. *J Neurosci* 31:8194–8209. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6215-10.2011
83. Velot L, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, et al (2015) Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.6196
84. Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A, et al (2009) 8p22 MTUS1 Gene Product ATIP3 Is a Novel Anti-Mitotic Protein Underexpressed in Invasive Breast Carcinoma of Poor Prognosis. *PLoS ONE* 4:e7239. doi: 10.1371/journal.pone.0007239
85. Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C (2010) An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends Endocrinol Metab* 21:684–690. doi: 10.1016/j.tem.2010.08.009
86. Molina A, Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Nahmias C (2011) ATIP, a novel superfamily of microtubule-associated proteins. *Med/Sci (Paris)* 27:244–246. doi: 10.1051/medsci/2011273244
87. Molina A, Velot L, Ghouinem L, et al (2013) ATIP3, a Novel Prognostic Marker of Breast Cancer Patient Survival, Limits Cancer Cell Migration and Slows Metastatic Progression by Regulating Microtubule Dynamics. *Cancer Res* 73:2905–2915. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3565
88. Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, et al (2008) Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48:1851–1863. doi: 10.1002/hep.22552
89. Dong X, Liu F, Sun L, et al (2009) Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J Pathol* n/a-n/a. doi: 10.1002/path.2662
90. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, et al (2012) Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J Proteomics* 75:5342–5355. doi: 10.1016/j.jprot.2012.06.013
91. Stypula-Cyrus Y, Mutyal NN, Dela Cruz M, et al (2014) End-binding protein 1 (EB1) up-regulation is an early event in colorectal carcinogenesis. *FEBS Lett* 588:829–835. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.046
92. Kumar M, Mehra S, Thakar A, et al (2016) End Binding 1 (EB1) overexpression in oral lesions and cancer: A biomarker of tumor progression and poor prognosis. *Clin Chim Acta* 459:45–52. doi: 10.1016/j.cca.2016.05.012
93. Le nIEWSKA K, Warbrick E, Ohkura H (2014) Peptide aptamers define distinct EB1- and EB3-binding motifs and interfere with microtubule dynamics. *Mol Biol Cell* 25:1025–1036. doi: 10.1091/mbc.E13-08-0504

94. van de Willige D, Hoogenraad CC, Akhmanova A (2016) Microtubule plus-end tracking proteins in neuronal development. *Cell Mol Life Sci* 73:2053–2077. doi: 10.1007/s00018-016-2168-3
95. Watanabe T, Kakeno M, Matsui T, et al (2015) TTBK2 with EB1/3 regulates microtubule dynamics in migrating cells through KIF2A phosphorylation. *J Cell Biol* 210:737–751. doi: 10.1083/jcb.201412075

## **Legends to Figures**

### **Legend to Figure 1**

#### **Structural organization and post-translational modifications of EB orthologs**

Schematic representation of the organization of human EB1, EB2, EB3 and yeast Bim1 and Mal3 polypeptides into functional domains, showing post-translational modifications. Two stars indicate phosphorylation sites that have been validated and for which the kinase is identified, and one star indicates those that have been validated but with no identified kinase. Other potential phosphorylation sites were identified by a phospho-proteomic approach and are not validated. Note that residues K220(A) and Y268(Tyr) in EB1 are sites of acetylation and detyrosination, respectively. CH : calponin-homology; EBH : EB-homology. C-ter : Carboxy-terminal region. Amino-acid numbering is indicated below each EB polypeptide.

### **Legend to Figure 2**

#### **Nucleotide-dependent EB-binding region at the MT plus end.**

MT polymerization is managed by incorporation of GTP-loaded  $\alpha$ -/ $\beta$ -tubulin dimers at growing ends. The different nucleotide states of tubulin are presented with the  $\beta$ -tubulin subunit in blue (GTP), grey (GDP-Pi) and black (GDP). Microtubule plus ends undergo two maturation steps : GTP hydrolysis and Pi release from GDP-Pi. The EB1-binding site comprises two adjacent tubulin-dimers loaded with either GTP-, GDP-Pi, or other intermediate states of GTP hydrolysis.

### **Legend to Figure 3**

#### **Reciprocal effects of EB1 and MTAs in regulating MT dynamics**

Microtubule-targeting agents (MTAs) regulate MT dynamics in two different ways.

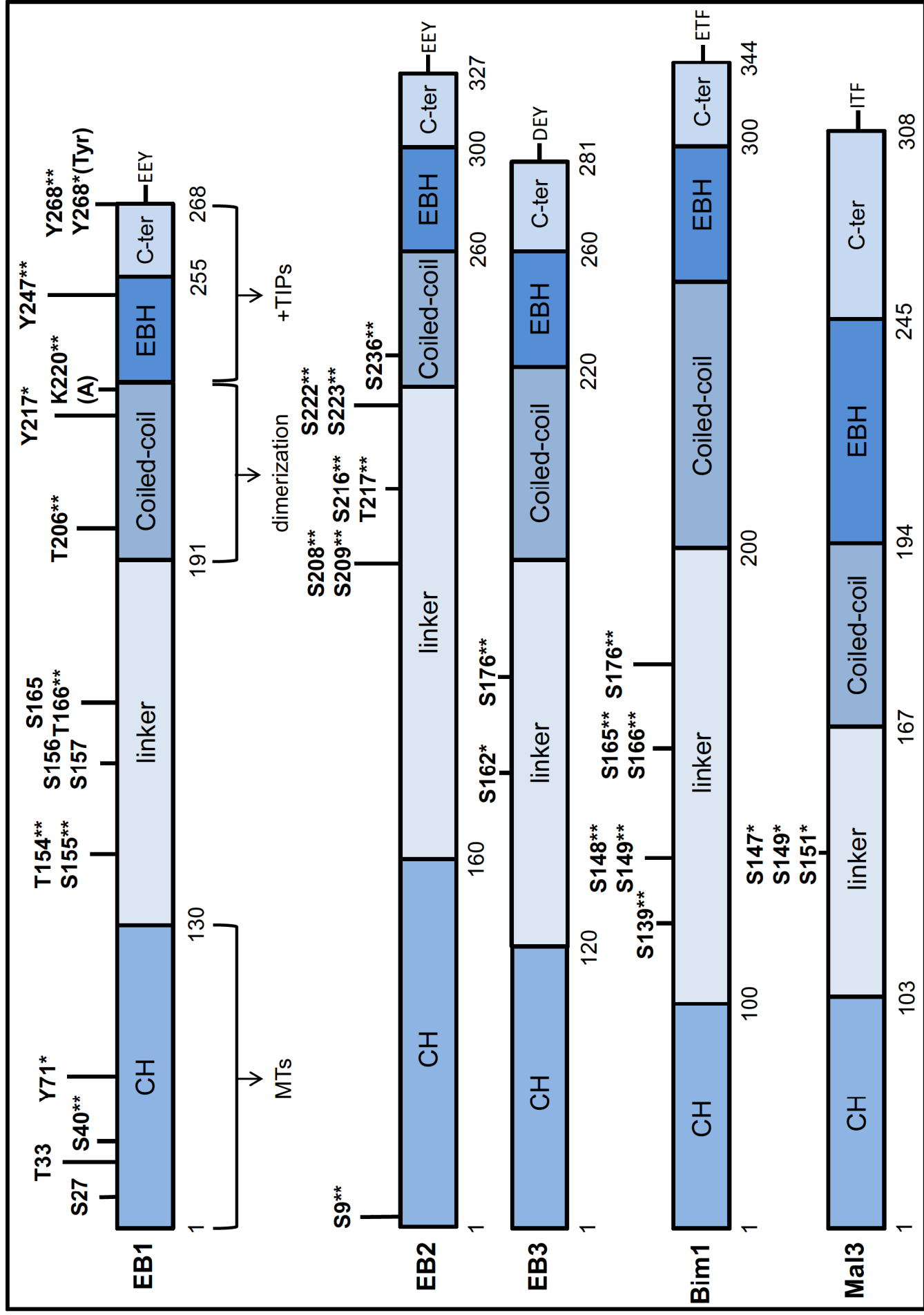
(1) They accelerate MT maturation steps, thereby shortening the EB-stabilizing cap at MT plus ends and leading to MT catastrophes. Note that EB1 and MTAs act synergistically to shorten the EB1 binding region. (2) MTAs also trigger Akt/GSK3 $\beta$ -

dependent phosphorylation of EB1 on residue T166, which contributes to MTA effects on MT plus end maturation. Those two effects of MTAs are not mutually exclusive.

#### **Legend to Figure 4.**

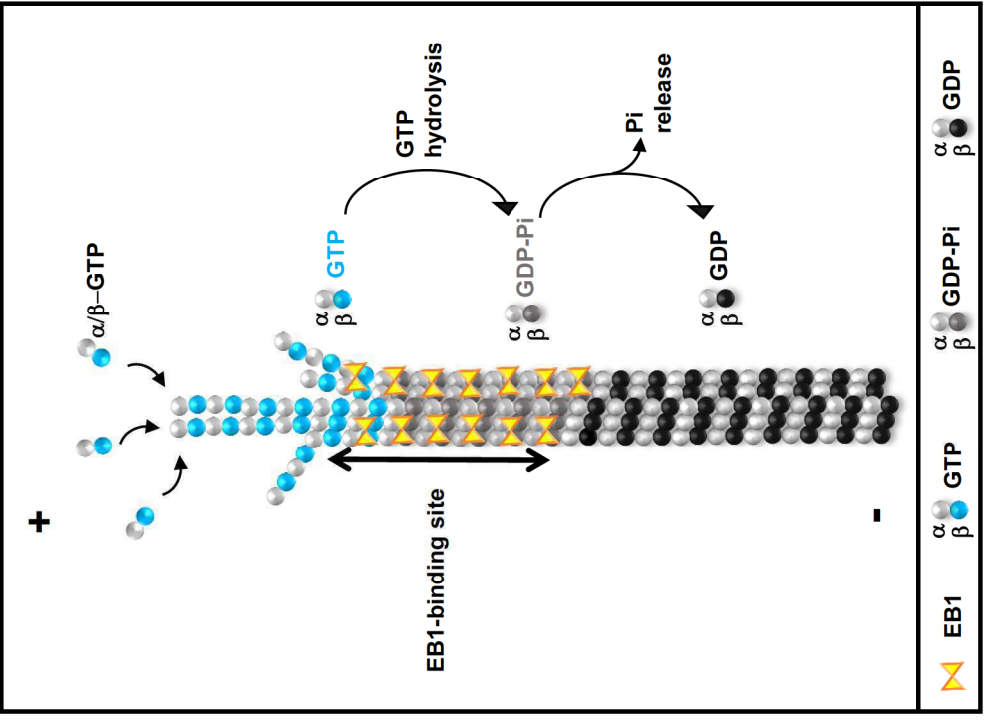
##### **Negative regulation of EB1 at growing ends by structural MAPs**

MAP1B negatively regulates EB1 by sequestration in the cytosol. Highly expressed tau, and NMDA-activated MAP2 proteins, redistribute EB1 to MT bundles. ATIP3 reduces EB1 turnover on its binding site, probably through post-translational modifications. These three mechanisms result in decreased EB1 accumulation at its binding site on growing MT ends and subsequent changes in MT dynamics.

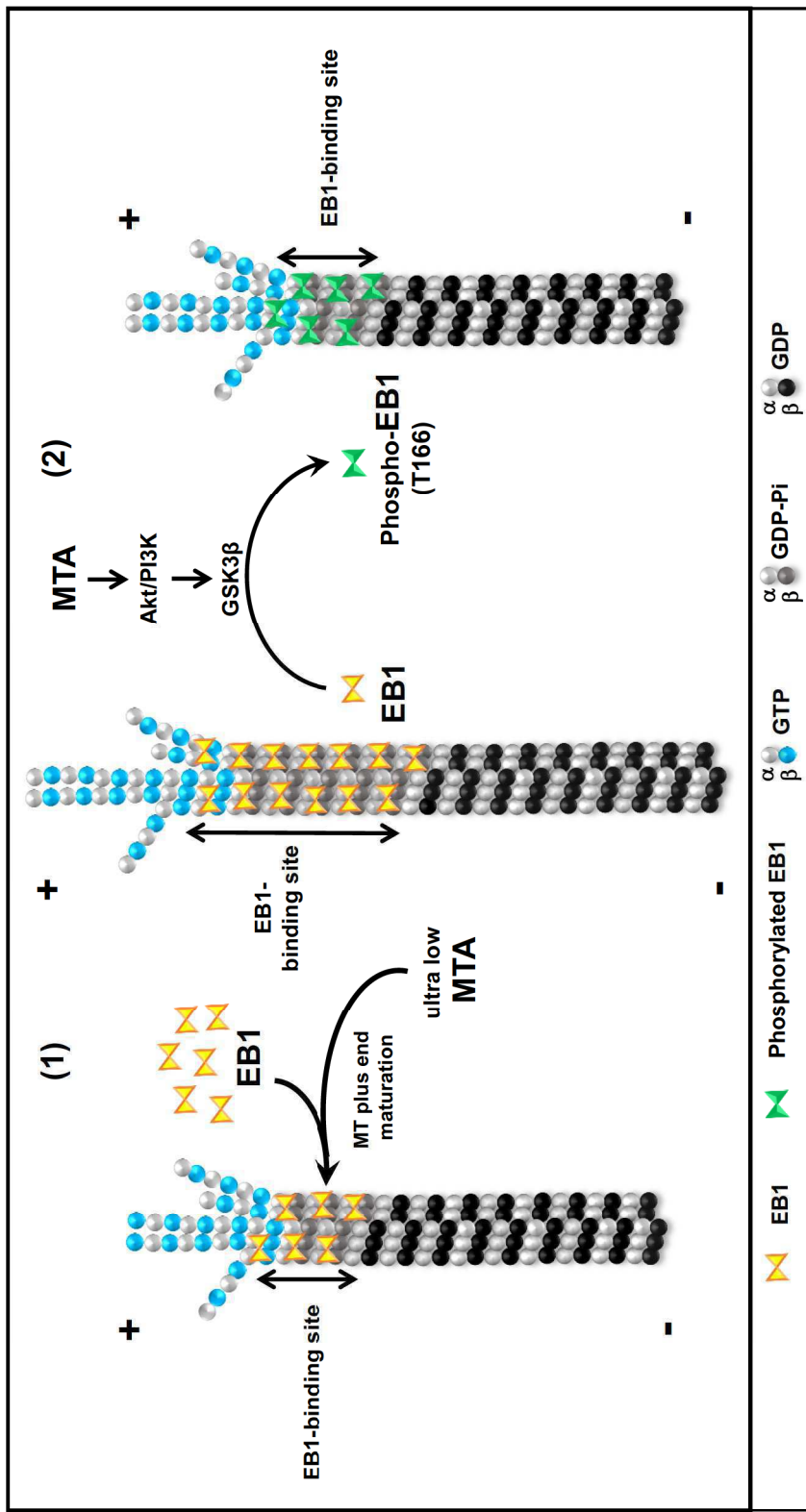


Nehlig et al., Figure 1

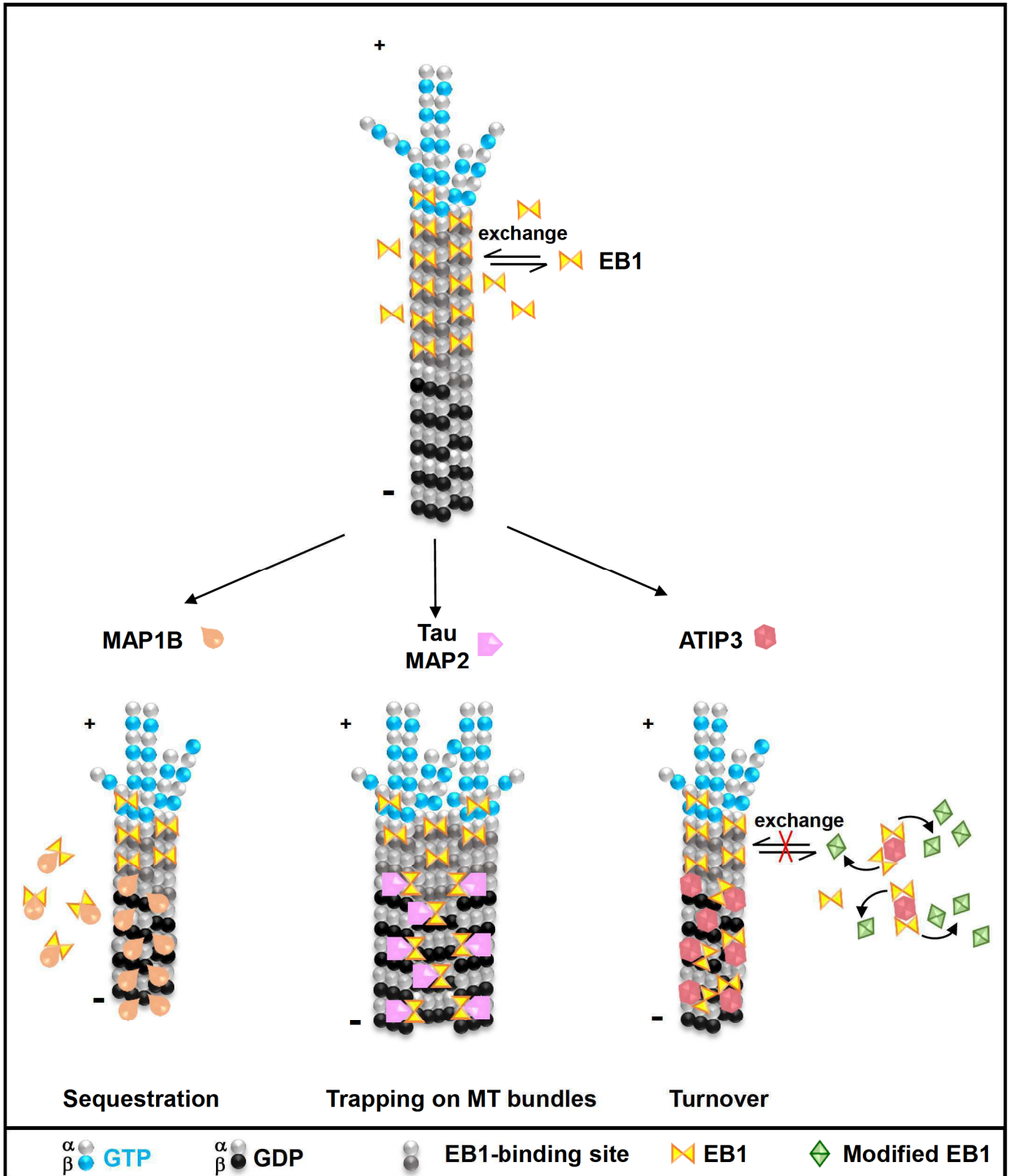




Nehlig et al., Figure 2



Nehlig et al., Figure 3



Nehlig et al., Figure 4

**Table 1 . Post-translational modifications of human and yeast EB orthologs**

<b>Protein</b>	<b>PTM site</b>	<b>Domain</b>	<b>Kinase</b>	<b>Effect</b>	<b>Reference</b>
<b>EB1 (human)</b>	S155, T166	linker	Akt/GSK3 $\beta$	MT dynamics	[52], [58]
	S40, T154, T206	CH, linker, CC	ASK1	Mitotic spindle	[53], [54]
	Y247, Y268	EBH, C-ter	Src	MT dynamics	[55]
	Y71, T206, Y217	CH, CC	nd	MT dynamics	[58]
	S27, T33, T154, S156, S165, S157	CH, linker, CC	nd	nd	[58]
	K220 (A)	CC	PCAF acetyltransferase	Cell migration MT dynamics Mitosis	[59], [60], [61]
	Y268 (Tyr)	C-ter	nd	Cell migration	[62]
<b>EB2 (human)</b>	S9, S208, S209, S216, T217, S222, S223	CH, linker	Aurora B, CDK1	MT dynamics Mitosis	[50]
	S236	CC	CK2	Cell adhesion	[56]
<b>EB3 (human)</b>	S176	linker	Aurora A/B	Proteasome MT dynamics	[48], [49]
	S162	linker	nd	MT dynamics	[57]
<b>Bim1 (yeast)</b>	S139, S148, S149, S165, S166, S176	linker	Aurora (Ipl1)	MT dynamics Mitosis	[46]
<b>Mal3 (yeast)</b>	S147, S149, S151	linker	nd	MT dynamics	[47]

Major sites of post-translational modification of EB1 family orthologs are indicated, together with the kinase involved and known associated effects. All residues correspond to phosphorylation sites except for K220 (A) and Y268 (Tyr) in EB1 that are sites of acetylation and de tyrosination/tyrosination, respectively. PTM : post-translational modification; CC : Coiled-coil domain; nd : not determined.



3. ARTICLE 3:

**Combinatorial expression of microtubule-associated EB1 and ATIP3 biomarkers improves breast cancer prognosis**

Rodrigues-Ferreira S, Nehlig A, Monchecourt C, Nasr S, Fuhrmann L, Lacroix-Triki M, Barberis IJ, Scott V, Delaloge S, Pistilli B, Viehl P, Dubois T, Vincent-Salomon A, André F, Nahmias C

(Breast Cancer Research and Treatment, 2018)

Comme présenté dans l'introduction, le cancer du sein est une maladie complexe dont le choix du traitement clinique est basé sur les caractéristiques clinico- pathologiques et les biomarqueurs moléculaires des tumeurs. L'émergence de techniques à haut débit pour les profils moléculaires des cancers du sein (DNA arrays et RNA-seq) a permis un important progrès dans le diagnostic, la classification et le pronostic des cancers du sein. L'accès aux grandes bases de données moléculaires donne l'opportunité aujourd'hui d'analyser rapidement l'expression individuelle ou combinée de gènes à partir de cohortes de patientes atteintes d'un cancer du sein, ce qui accélère l'identification de nouveaux biomarqueurs moléculaires qui sont cruellement nécessaires pour améliorer la classification des cancers du sein et le choix dans le type de traitement à administrer.

Nos résultats précédemment publiés suggèrent que l'altération d'ATIP3 et d'EB1 pourrait modifier le nombre de complexes moléculaires intracellulaires ATIP3-EB1 et ainsi l'accumulation d'EB1 à l'extrémité croissante du MT et par conséquent l'instabilité dynamique du MT. De façon intéressante, il serait possible que les effets délétères des forts niveaux d'expression d'EB1 soient modérés par de forts niveaux d'expression d'ATIP3 tandis que les tumeurs exprimant de forts niveaux d'EB1 et de faibles niveaux d'ATIP3 pourrait être les plus agressives. Dans le but d'étudier la pertinence clinique de l'interaction ATIP3-EB1, la valeur pronostique des niveaux d'expression d'ATIP3 et EB1 dans le cancer du sein a été évaluée. Pour cela, la valeur du gène *MAPRE1*, codant pour EB1, seul ou en combinaison avec le gène *MTUS1*, codant pour ATIP3, a été étudiée pour la classification moléculaire, le diagnostic et le pronostic des patientes atteintes d'un cancer du sein.

Les niveaux d'expression du gène *MAPRE1* ont été analysés à partir d'une étude transcriptomique de quatre cohortes indépendantes de patientes atteintes d'un cancer du sein. L'analyse a montré que les transcrits d'EB1 étaient significativement plus élevés dans les cancers malins comparé aux cancers bénins, et dans les tumeurs de haut grade (III) en comparaison aux grades I et II. De plus, de forts niveaux de *MAPRE1* sont associés à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. La valeur diagnostique de la combinaison de l'expression de gènes *MAPRE1* et *MTUS1* a ensuite été évaluée. Les tumeurs exprimant de forts niveaux de *MAPRE1* et de faibles niveaux de *MTUS1* incluent la majorité des tumeurs malignes et sont associées aux tumeurs de haut grade. De plus, la survie globale

et la survie sans rechute sont fortement réduites chez les patientes exprimant de forts niveaux de *MAPRE1* et de faibles niveaux de *MTUS1* et de façon cohérente le pourcentage de survie après 5 ans est le plus faible dans ce même groupe de patientes. De façon intéressant la combinaison d'une forte expression de *MAPRE1* et d'une faible expression de *MTUS1* permet une meilleure classification des tumeurs en comparaison à l'expression seule de *MAPRE1*.

Les résultats d'analyses de puce à ADN ont été confirmés par des analyses d'immunohistochimie réalisées sur des TMA (Tissue microarrays) et démontrent que la valeur pronostique de la combinaison des expressions d'EB1 et d'ATIP3 est améliorée dans le cancer du sein par rapport à l'expression seule d'EB1.

Ces analyses indiquent que la combinaison d'ATIP3 et EB1, au niveau génétique et protéique, permet d'identifier un groupe de tumeurs de haut grade très agressives exprimant de fort niveaux d'EB1 et de faibles niveaux d'ATIP3, qui représentent 20 à 30% de tous les cancers du sein et qui sont associés à des taux de survie réduits chez les patientes. Cette combinaison des deux biomarqueurs ATIP3 et EB1 pourrait améliorer le pronostic du cancer du sein par comparaison à EB1 seul et serait utile pour une meilleure classification des cancers afin de mieux adapter la thérapie ciblée administrée aux patientes.



## **Combinatorial expression of microtubule-associated EB1 and ATIP3 biomarkers improves breast cancer prognosis**

**Sylvie RODRIGUES-FERREIRA<sup>1,2,3,4</sup>, Anne NEHLIG<sup>1,2,3</sup>, Clarisse MONCHECOURT<sup>1,2,3</sup>, Sarah NASR<sup>5</sup>, Laetitia FUHRMANN<sup>6</sup>, Magali LACROIX-TRIKI<sup>5</sup>, Ingrid GARBERIS<sup>1,2,3</sup>, Véronique SCOTT<sup>1,2,3</sup>, Suzette DELALOGÉ<sup>5</sup>, Barbara PISTILLI<sup>5</sup>, Philippe VIELH<sup>7</sup>, Thierry DUBOIS<sup>8</sup>, Anne VINCENT-SALOMON<sup>6</sup>, Fabrice ANDRE<sup>1,2,3</sup>, Clara NAHMIA<sup>1,2,3#</sup>**

1. INSERM U981, Department of Molecular Medicine, Gustave Roussy Cancer Center, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.
2. LabEx LERMIT, University Paris Saclay, 5 Rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.
3. University Paris Sud, 63 rue Gabriel Peri, 94270 Le Kremlin-Bicetre, France.
4. Inovarian SAS, 75013 Paris, France.
5. Department of Medical Oncology, Gustave Roussy Cancer Center, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.
6. Institut Curie, PSL Research University, Pathology Department, 26 rue d'Ulm, F-75005, Paris, France.
7. Department of Medical Biology and Pathology, Gustave Roussy, Cancer Center 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.
8. Institut Curie, PSL Research University, Translational Research Department, Breast Cancer Biology Group, Paris, France.

# to whom correspondence should be sent : Gustave Roussy Cancer Center, Dept of Molecular Medicine, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.

Email : clara.nahmias@inserm.fr

### **Keywords**

**MAPRE1, MTUS1, diagnosis, prognosis, breast cancer, biomarkers combination**

## **Abstract**

**Purpose.** The identification of molecular biomarkers for classification of breast cancer is needed to better stratify the patients and guide therapeutic decisions. The aim of this study was to investigate the value of *MAPRE1* gene encoding microtubule-end binding proteins EB1 as a biomarker in breast cancer and evaluate whether combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* gene encoding EB1-negative regulator ATIP3 may improve breast cancer diagnosis and prognosis.

**Methods.** Probeset intensities for *MAPRE1* and *MTUS1* genes were retrieved from Exonhit splice array analyses of 45 benign and 120 malignant breast tumors for diagnostic purposes. Transcriptomic analyses (U133 Affymetrix array) of one exploratory cohort of 150 invasive breast cancer patients and two independent series of 130 and 155 samples were compared with clinical data of the patients for prognostic studies. A tissue microarray from an independent cohort of 212 invasive breast tumors was immunostained with anti-EB1 and anti-ATIP3 antibodies.

**Results.** We show that *MAPRE1* gene is a diagnostic and prognostic biomarker in breast cancer. High *MAPRE1* levels correlate with tumor malignancy, high histological grade and poor clinical outcome. Combination of high-*MAPRE1* and low-*MTUS1* levels in tumors is significantly associated with tumor aggressiveness and reduced patient survival. IHC studies of combined EB1/ATIP3 protein expression confirmed these results.

**Conclusions.** These studies emphasize the importance of studying combinatorial expression of EB1 and ATIP3 genes and proteins rather than each biomarker alone. A population of highly aggressive breast tumors expressing high-EB1/low-ATIP3 may be considered for the development of new molecular therapies.

## Introduction

Breast cancer is a complex disease whose clinical management relies on well-established clinico-pathological characteristics and molecular biomarkers. The emergence of high-throughput techniques for molecular profiling of breast tumors, such as DNA arrays and RNA-seq, has allowed extensive progress in the diagnosis, classification and prognosis of breast tumors. The availability of large molecular databases now provides the opportunity to rapidly analyze individual and combinatorial expression of genes in cohorts of breast cancer patients, which may accelerate the identification of novel molecular biomarkers that are urgently needed for better stratifying breast cancer patients and deciding the type of therapy to be administered. The microtubule (MT) cytoskeleton plays a key role in various biological processes such as intracellular transport, cell migration and mitosis, all of which are altered in cancer. MTs are polarized protofilaments that constantly alternate between phases of polymerization (growth) and depolymerization (shrinkage) at their plus ends [1,2]. This dynamic behavior is essential for MTs to explore the cytosol and ensure cell homeostasis and is tightly regulated by a wide number of MT-associated proteins (MAPs) [3]. Any defect in these regulatory proteins may alter the organisation and/or function of MTs, with major consequences on cancer initiation or progression.

End-binding protein 1 (EB1) is the leader member of a subfamily of MAPs including EB2 and EB3, encoded by homologous genes designated *MAPRE1*, *MAPRE2* and *MAPRE3*, respectively [4]. EB1 and EB3 have been extensively studied, EB1 being ubiquitous and EB3 being predominant in the brain, whereas EB2 remains less characterized [5]. EB1 preferentially binds and accumulates at growing MT ends and is considered a surrogate marker of MT dynamics [6]. Upon binding to MT ends, EB1 accelerates the rate of catastrophe (rapid depolymerization) and thus also functionally contributes to MT-end maturation and dynamic

instability [7]. In addition, EB1 recruits a large number of regulatory proteins at MT plus ends, thereby orchestrating the regulation of MT dynamics and MT targeting to organelles [8-10].

The pivotal role of EB1 on MT dynamics suggests that alterations of EB1 expression or function may have important consequences in cancer. Indeed, up-regulation of EB1 protein in tumor samples has been reported in breast cancer [11], glioblastoma [12], hepatocarcinoma [13], oral [14] and colorectal cancer [15,16]. In breast cancer, high EB1 protein levels have been shown to correlate with tumor malignancy and high tumor grade [11]. However, the status of *MAPRE1* gene encoding EB1, and its paralogs *MAPRE2* and *MAPRE3*, has not yet been evaluated in breast cancer, and it remains to be established whether EB1 represents a prognostic biomarker of breast cancer patient survival.

Recent studies have identified several structural MAPs as endogenous antagonists of EB1 functions at MT plus ends [5]. Among them, the ATIP3 protein encoded by candidate tumor suppressor gene *MTUS1* has been described as a prognostic biomarker down-regulated in invasive breast cancer [17, 18]. ATIP3 is a potent MT-stabilizer that markedly reduces breast tumor growth and distant metastasis [18]. ATIP3 directly binds to EB1 in the cytosol and prevents its turnover and accumulation at growing MT ends, thereby reducing MT dynamics and cell polarity [19]. These data suggest that altered expression of either ATIP3 or EB1 in breast tumors may impact the levels of intracellular ATIP3-EB1 molecular complexes that govern EB1 function at MT plus ends. This raises the interesting possibility that deleterious effects of high EB1 levels in breast tumors may be moderated by high levels of ATIP3 whereas tumors with high-EB1 and low-ATIP3 levels may remain more aggressive.

The present study investigates the value of *MAPRE* genes, alone or in combination with *MTUS1*, for molecular classification, diagnosis and prognosis of breast cancer patients. We show that high *MAPRE1* – but not *MAPRE2* and *MAPRE3* - levels correlate with tumor malignancy and poor clinical outcome for breast cancer patients, and that combinatorial

analysis of *MAPRE1* and *MTUS1* expression refines breast cancer diagnosis and prognosis compared to *MAPRE1* alone.

## **Methods**

### **Breast tumor samples and gene arrays**

In a first cohort of patients (Cohort#1) designed for tumor classification, samples were obtained by fine-needle aspiration of breast lesions from patients referred to the breast diagnosis center of the Gustave Roussy Center (Villejuif, France) between 2006 and 2007 [20]. 165 samples, among which 45 benign and 120 malignant tumors, were profiled on a Splice Array (Exonhit, France) [21]. Patient characteristics and probeset intensities are presented in Supplemental Table S1.

The exploratory cohort of breast cancer patients (Cohort#2), designed for prognostic purposes, comprises 150 infiltrating breast carcinomas obtained from patients who were included between 1988 and 1999 in the prospective database initiated in 1981 by the Institut Curie Breast cancer group (Curie, Paris, France) [17]. Samples were analyzed by Affymetrix IIG-U133 DNA array hybridization as described [17, 18, 22]. Patients included in the study were aged 33 to 88 and were treated by radiotherapy combined or not with hormono- or chemotherapy after surgical resection of the tumor. Immunohistological levels of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) were recorded according to standardized guidelines using 10% as the cut-off for ER and PR positive cells [23]. For human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), only membrane staining was considered with a 30% cut-off as recommended [24]. Patient characteristics and probeset intensities are presented in Supplemental Table S2. Two independent series of breast cancer patients, designated Cohort#3 [25, 26] and Cohort#4 [18] are described in Supplemental Methods and Supplemental Tables S3 and S4.

### **Immunohistochemical analysis of breast cancer tissue microarray (TMA)**

Samples of invasive ductal carcinomas (IDCs) were surgically removed before any radiation, hormonal or chemotherapy treatment at Institut Curie from 2005 to 2006 [27]. Patient

characteristics and clinical data are presented in Supplemental Table S5. TMA consisted of replicate 1-mm diameter tumor cores selected from whole-tumor tissue section in two most representative tumor areas (high tumor cell density) of each tumor sample. Alcohol formalin acetic acid-fixed paraffin-embedded samples were analyzed by immunohistochemistry (IHC) staining using EnVision FLEX kit (Dako) according to the manufacturer's instructions. For EB1 staining, heat-mediated antigen retrieval was performed in Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid (EDTA) buffer pH 6 in water bath for 30 min and monoclonal mouse anti-EB1 antibodies (BD Biosciences) diluted 1:300 were incubated overnight at 4°C. ATIP3 staining was performed as previously described [17] using monoclonal anti-MTUS1 antibodies (Abnova) diluted 1 :100. Slides were counterstained with hematoxylin. HeLa cells transfected with control siRNA were used as positive control for EB1 staining, and cells transfected for 48h with EB1-specific siRNA (Dharmacon) [19] were considered as negative control. Silencing efficiency was validated by immunoblotting using anti-EB1 antibodies (BD Biosciences) diluted 1 :1000 and anti-alpha-tubulin antibodies (Sigma) diluted 1 :1000 as internal control. EB1 immunoreactivity in tissue sections was classified semi-quantitatively into 5 classes (0, <1, 1, 2, 3) according to the intensity of cytoplasmic staining of tumor cells. Scores for EB1 immunostaining were defined as 0 (undetectable staining on high-power field (x40), <1 (only visible on high-power field (x40), 1 (detected on medium-power field (x10-x20) but well visualized on high-power field (x40), 2 (detected on low-power field (x4-x5) but well visualized on medium-power field (x20), and 3 (well visualized on low-power field (x4-x5). Samples were independently evaluated by two pathologists of different institutes. EB1 expression was classified on a semi-quantitative basis, immunostaining was considered weak for a score from 0 to 1 and strong for a score of 2 to 3. Scoring for ATIP3 staining was evaluated as described [17].

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were done using JMP-7 and GraphPad Prism 6.0 softwares. The association between clinicopathological characteristics and the expression level of either *MAPRE1*, *MTUS1*, or their combination were calculated using the Mann-Whitney test for continuous variables and using the chi-squared and the Fisher exact tests for dichotomized variables. Dot plot analyses were done using Mann–Whitney test. Overall survival (OS) and Relapse-free survival (RFS) curves were plotted according to the method of Kaplan–Meier and compared by the log-rank test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.



## Results

### **Combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes improves breast cancer diagnosis**

Expression levels of the *MAPRE1* gene encoding End-Binding protein EB1 were evaluated in a splice-array profiling of 165 breast samples including 120 malignant cancers and 45 benign lesions (Cohort#1) [20]. Only T probesets - that identify expressed exons - were taken into account to avoid potential bias due to alternative exon splicing. Analysis of probesets intensities revealed that *MAPRE1* transcripts are significantly higher in malignant compared to benign breast tumors (Fig.1a and Supplemental Fig.S1). Heatmap analysis of *MAPRE1* gene expression was then used to classify tumor samples according to high or low levels of EB1 transcripts (Fig.1b). As shown in Fig. 1c and Table 1, 65% of low-*MAPRE1* expressing tumors were malignant compared to 79,6% of those expressing high-*MAPRE1* levels, further indicating that elevated expression of *MAPRE1* gene is associated with tumor malignancy. In contrast, expression levels of paralog *MAPRE2* and *MAPRE3* genes encoding EB2 and EB3 proteins, respectively, were either decreased (Supplemental Fig.S2a) or unchanged (Supplemental Fig.S2b) in cancer samples compared to benign lesions.

Expression of the *MTUS1* gene, whose major product ATIP3 antagonizes EB1 functions [5, 19], was analyzed in the same samples (Supplemental Table S1). Analysis of *MTUS1* probesets intensities (Fig.1d and Supplemental Fig.S3) revealed that *MTUS1* levels are significantly decreased in malignant breast tumors compared to benign lesions. Classification of samples into clusters expressing high- and low-*MTUS1* using heatmap analysis (Fig.1e) further indicated that 93,6% of low-*MTUS1* tumors were malignant compared to 54% of tumors with high-*MTUS1* levels (Fig.1f, Table 1).

We next evaluated the diagnostic value of combining *MAPRE1* and *MTUS1* gene expression. Tumors expressing high-*MAPRE1* and low-*MTUS1* levels included a majority (97.7%) of

malignant samples, compared to 45.2% among those expressing low-*MAPRE1* and high-*MTUS1* (Fig.1g). Of interest, combining *MAPRE1* and *MTUS1* gene expression allowed better tumor classification compared to each biomarker alone (Fig.1g, Table 1). Together these studies point to *MAPRE1* and *MTUS1* as valuable diagnostic biomarkers and suggest that analyzing combinatorial expression of these genes may refine tumor classification and improve breast cancer diagnosis.

### **Combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes correlates with tumor grade**

Analysis of *MAPRE1* gene levels in invasive breast carcinomas from 150 patients of the Curie Institute (Exploratory Cohort#2) revealed that *MAPRE1* expression is significantly increased in high grade (GIII) tumors compared to those of histological grade I ( $p=0.0003$ ) and grade II ( $p=0.0242$ ) (Fig.2a, Table 2). Tumors were classified into clusters expressing low or high levels of EB1 transcripts according to heat-map analysis of *MAPRE1* probesets intensities (Fig.2b). Results indicate that the percentage of grade-III tumors is 3 times more elevated among high-*MAPRE1* (36,8%) compared to low-*MAPRE1* (10,7%) expressing tumors (Fig.2c, Table 2). Conversely, grade-I tumors were significantly less abundant among high-*MAPRE1* (18,4%) compared to low-*MAPRE1* (49,1%) groups (Table 2), indicating that high transcript levels correlate with high histological grade.

Two independent series of 130 and 155 invasive carcinoma from breast cancer patients of the Curie Institute (Cohort#3) (Supplemental Table S3) and Gustave Roussy Hospital (Cohort #4) (Supplemental Table S4) were then analyzed. As shown in Supplemental Fig.S4a, *MAPRE1* gene levels were higher in cancer samples compared to 11 normal tissues. In both sets of tumors, *MAPRE1* levels were increased in grade-III versus grade-I/II invasive tumors (Supplemental Fig.S4a, S4d). Accordingly, the percentage of high-grade tumors was also elevated in high-*MAPRE1* compared to low-*MAPRE1* breast tumors from Cohorts #3 and #4 (Supplemental

Fig.S4b, S4c, S4e, S4f and Supplemental Table S6, S7), therefore confirming that high-*MAPRE1* correlates with tumor aggressiveness. Of note, *MAPRE1* levels were not significantly different among ER-positive and ER-negative breast tumors of Cohort#2 (Supplemental Fig.S4g) and Cohort#4 (Supplemental Fig.S4h), although in Cohort#3, high *MAPRE1* levels were significantly associated with ER-negative tumors (Suppl Fig.S4i and Supplemental Table S6). Of note, the percentage of ER-negative tumors included in Cohort #2 and #4 is very low (18,7% and 6,6%, respectively) compared to that in Cohort#3 (54,6%), which may explain why results do not reach significance in these two series of patients. Future studies including new cohorts with larger numbers of ER-negative breast cancer samples are warranted to address that question.

We then investigated whether *MAPRE2* and *MAPRE3* genes may also be regulated in invasive breast cancer. Probesets intensities for these two genes were examined in each cohort of invasive breast carcinomas when data were available, and results (Supplemental Fig.S5) revealed that *MAPRE2* and *MAPRE3* gene levels do not consistently correlate with tumor grade. Together, these studies indicate that increased levels of *MAPRE1*, but not *MAPRE2* or *MAPRE3* genes, correlate with high tumor grade in breast cancer.

Previous studies have shown that *MTUS1* gene is down-regulated in breast cancer samples compared with normal tissue, and that low-*MTUS1* levels correlate with high tumor grade [17, 18]. We thus investigated the impact of combinatorial *MAPRE1* and *MTUS1* expression on histological grade. Based on heatmap classification of 150 tumors of Cohort#2 according to *MAPRE1* and *MTUS1* probesets intensities, four clusters of tumors expressing either low or high levels of each transcript were established (Fig.2d). Comparison with histological grade revealed that cluster 3 - expressing high-*MAPRE1* and low-*MTUS1* levels - is significantly associated with higher percentage of high-grade tumors (44.4% grade-III tumors in cluster 3 compared to 18.3%, 2% and 18.2% in clusters 1, 2 and 4, respectively) (Fig.2e, Table 2).

Consistently, 46.1% of grade-III tumors were from cluster 3, compared to 18% and 6.4% of grade-II and grade-I tumors, respectively (Fig.2f). Interestingly, among high-*MAPRE1* expressing tumors that are the most aggressive, those with low-*MTUS1* (cluster 3) were predominantly of high grade compared to those with high-*MTUS1* (cluster 4) (Fig.2e), indicating that combined expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes better distinguishes tumor grade than *MAPRE1* alone. Similar results were obtained using two independent sets of tumors (Supplemental Tables S6 and S7, Supplemental Fig.S6). Of note, aggressive tumors from cluster 3 represent a substantial proportion of all breast tumors (18% in Cohort#2, 31.5% in Cohort#3 and 23.9% in Cohort#4) (Table 2 and Supplemental Tables S6 and S7).

### **Combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* improves breast cancer prognosis**

The prognostic value of *MAPRE1* in breast cancer was assessed by comparing probesets intensities with clinical data of patient survival. The probability of overall survival was significantly reduced in patients with breast tumors expressing high *MAPRE1* compared with low *MAPRE1* levels (HR 2.22; 95% CI 1.19-4.12; p=0.0058) (Fig.3a and Table 3). The Kaplan-Meier plotter tool available online was also used to interrogate public databases [28]. High *MAPRE1* expression correlated with poorer overall survival in 1402 breast cancer patients (Supplemental Fig.S7a) and poorer relapse-free survival in 3115 patients (Supplemental Fig.S7b), further comforting our results that high-*MAPRE1* levels are associated with poor prognosis in breast cancer.

To further investigate whether combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* may have improved prognostic value compared to each single gene, we evaluated the probability of survival among tumor clusters classified according to *MAPRE1* and *MTUS1* probeset intensities as defined previously (Fig.2d). Results indicate that overall survival and relapse-free survival are significantly reduced (p=0.0001) for patients of cluster 3 - expressing high-*MAPRE1* and

low-*MTUS1* levels - compared to all other clusters (Fig.3b, 3c, Table 2 and Supplemental Fig.S7c-d, Table S6). Accordingly, the percentage of patients surviving after 5 years was lower for tumors of cluster 3 (42%) compared to those of cluster 1 (61%), cluster 2 (85%) and cluster 4 (60%) (Fig. 3d). Thus, combining *MAPRE1* and *MTUS1* gene levels improves breast cancer prognosis compared to *MAPRE1* or *MTUS1* alone. Multivariate analyses including ER, PR, HER2, tumor grade, *MAPRE1* and *MTUS1* gene levels further revealed that *MAPRE1/MTUS1* gene combination (HR 3.50; CI 1.12-10.85; p 0.015) is an independent indicator of overall survival whereas *MAPRE1* alone (HR 1.40; CI 0.40-4.89; p 0.299) is not (Table 3). Notably, *MTUS1* (HR 2.7; CI 1.34-5.42; p 0.002) is also identified as an independent prognostic factor, in line with previous studies [18].

We then turned to IHC experiments to evaluate whether combined expression of EB1 and ATIP3 at the protein level may also improve breast cancer prognosis. Experimental conditions set up for EB1 staining (Supplemental Fig.S7e) were used to detect EB1 expression in patient biopsies. As expected, EB1 immunostaining was weak in normal breast and was markedly increased in the cytosol of tumor samples (Supplemental Fig.S7f). Tissue microarrays from 212 invasive breast tumors were then analyzed (Supplemental Table S5) and EB1 immunostaining (Fig.3e) was compared with data for patients survival. Results show that the probability of overall survival was reduced in patients with tumors showing strong EB1 staining (HR 3.46; CI 1.065-7.284; p=0.037) (Fig.3f, Table 4), therefore validating the EB1 protein as a prognostic biomarker in breast cancer.

To further evaluate the impact of EB1-ATIP3 combination on patient survival, serial sections of the TMA were stained with anti-ATIP antibodies and samples were classified according to strong or weak EB1 and ATIP3 immunostaining (Fig.3g and Supplemental Table S5). Results indicate that the probability of survival is significantly reduced in patients with tumors expressing strong-EB1 and weak-ATIP3 compared to all other groups (p=0.0153) (Fig.3h),

which comforts the data obtained at the mRNA level (Fig.3b). Consistent with previous results on DNA array analyses, this group of aggressive breast tumors represents 30.4% of all tumor samples (Table 4). Together, these data confirm DNA array results and demonstrate the improved prognostic value of combinatorial EB1/ATIP3 expression in breast cancer.

## Discussion

This study examined the diagnostic and prognostic value of *MAPRE* genes expression in breast cancer, either alone or in combination with candidate tumor suppressor *MTUS1* gene. We found that *MAPRE1*, but not *MAPRE2* nor *MAPRE3*, is up-regulated in malignant tumors compared to benign lesions, and in high-grade compared to low-grade invasive carcinoma. These results are consistent with previous studies [10] reporting EB1 as an oncogenic protein up-regulated in malignant and high-grade breast tumors. In contrast to this latter study however, our data did not clearly correlate EB1 levels with ER status in breast tumors and more studies are required to investigate this question. Results presented here further indicate that high expression of *MAPRE1* gene and encoded protein EB1 correlates with reduced survival of the patients, pointing out this molecule as a novel prognostic biomarker in breast cancer.

We further demonstrate here that combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes significantly improves breast cancer diagnosis and prognosis compared to *MAPRE1* and *MTUS1* alone. Combining data on *MAPRE1* and *MTUS1* expression both at the gene and protein levels allowed to identify a group of aggressive high-grade tumors with high-EB1 and low-ATIP3 levels, that represent 20% to 30% of all breast tumors and are associated with reduced patient survival rates. While a number of studies have identified gene signatures associated with poor prognosis of breast cancer patients [29, 30], this is to our knowledge the first demonstration that combinatorial expression of two defined biomarkers with known associated molecular mechanisms may be used as a tool to select populations of cancer patients for personalized therapy. Further studies are warranted to evaluate the feasibility of using *MAPRE1* and *MTUS1* biomarkers as diagnostic and prognostic tools in the clinic.

On a molecular basis, these results are supported by our previous findings that ATIP3 acts as a brake on EB1 functions through binding and reducing EB1 turnover at MT growing ends [19]. In the absence of ATIP3, EB1 accumulates at MT ends and forms large comet-like structures

that specify increased MT dynamics [18]. Results on breast cancer patients favor a model in which in breast tumors with low ATIP3 levels, the brake is turned off and the oncogenic activity of EB1 is increased. This opens the way to novel molecular therapeutic strategies involving delivery of active domains of ATIP3 to target the population of high-EB1/low-ATIP3 breast tumors that remain of poor prognosis. Alternative approaches may rely on the design or discovery of small molecule modulators of EB1 binding at MT ends to compensate for ATIP3 loss in the target population of breast tumors identified here. An integrative approach based on the discovery of small molecule scaffolds that target EB1 interactions with other partners at MT ends has indeed been recently described [31].

In conclusion, we show here for the first time that combinatorial expression of MT-associated EB1 and ATIP3 biomarkers improves breast cancer prognosis compared to each biomarker alone, and may be useful for better stratifying the patients for targeted molecular therapy. Further studies are warranted to analyze combinations of *MAPRE1* and *MTUS1* genes expression in other types of cancers such as glioblastoma [11], hepatocarcinoma [12], and oral [13] and colorectal [15] cancers, in which high-EB1 protein levels have been shown to correlate with poor clinical outcome.

## **Acknowledgements**

We wish to thank Dr Céline Lefebvre for helpful discussion and Nicolas Signolle and Ibrahim Bouakka for excellent assistance. This work was supported by the INSERM, the CNRS, the University Paris-Saclay, the Institut Gustave Roussy, the A\*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the “Investissements d’Avenir” French Government program, managed by the ANR and ITMO Cancer AVIESAN as part of the Cancer Plan No. PC201419, the Labex LERMIT, the Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer, the association Odyssea, GEFLUC and Prolific.



## **Compliance with ethical standards**

### **Funding**

This study was funded by the A\*MIDEX project (n°ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the “Investissements d’Avenir” French Government program, managed by the ANR and ITMO Cancer AVIESAN as part of the Cancer Plan No. PC201419. Anne Nehlig was recipient of grants from la Ligue Nationale contre le Cancer, the association Odyssea and Prolific. This study was funded by the Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer, the Labex LERMIT, the association GEFLUC and Prolific.

### **Compliance with current laws**

The authors declare that all experiments presented here comply with the current laws of France

### **Conflict of interests :**

The authors declare that they have no conflict of interests.

### **Ethical approval :**

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

All procedures used in studies involving human participants have been previously published elsewhere and were in accordance with ethical standards of the Institut Curie and Gustave Roussy committees, and with 1964 Helsinki declaration.

Informed consent was obtained from all individual participants included in this study.

## References

1. Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242
2. Howard J, Hyman AA (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422:753–758
3. Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:309–322
4. Su L-K, Qi Y (2001) Characterization of human MAPRE genes and their proteins. *Genomics* 71 :142–149
5. Nehlig A, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, Honoré S, Nahmias C (2017) Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 74(13):2381-2393
6. Vaughan KT (2005) TIP maker and TIP marker; EB1 as a master controller of microtubule plus ends. *J Cell Biol* 171(2) :197-200
7. Maurer SP, Cade NI, Bohner G, Gustafsson N, Boutant E, Surrey T (2014) EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Curr Biol* 24(4):372-384
8. Galjart N (2010) Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol* 20:R528–R537
9. Jiang K, Toedt G, Montenegro Gouveia S, Davey NE, Hua S, van der Vaart B et al (2012) A proteome-wide screen for Mammalian SxIP Motif-containing microtubule plus-end tracking proteins. *Curr Biol* 22:1800-1807
10. Kumar P, Wittmann T (2012) +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol* 22:418–428
11. Dong X, Liu F, Sun L, Liu M, Li D, Su D et al (2010) Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J Pathol* 220(3):361-369
12. Berges R, Baeza-Kallee N, Tabouret E, Chinot O, Petit M, Kruczynski A et al (2014) End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to Vinca-alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget* 5(24):12769-12787
13. Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T et al (2008) Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48(6):1851-1863
14. Kumar M, Mehra S, Thakar A, Shukla NK, Roychoudhary A, Sharma MC et al (2016) End Binding 1 (EB1) overexpression in oral lesions and cancer : A biomarker of tumor progression and poor prognosis. *Clin Chim Acta* 459:45-52
15. Stypula-Cyrus Y, Mutyal NN, Dela Cruz M, Kunte DP, Radosevich AJ, Wali R et al (2009) End-binding protein 1 (EB1) up-regulation is an early event in colorectal carcinogenesis. *FEBS Lett* 588(5):829-835
16. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H et al (2012) Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J Proteomics* 75(17) :5342-5355
17. Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A, Cazaubon S, Gruel N, Colasson H et al (2009) 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One* 4(10):e7239
18. Molina A, Velot L, Ghouinem L, Abdelkarim M, Bouchet BP, Luissint AC et al (2013) ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits

- cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res* 73(9):2905-2915
19. Velot L, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, Nehlig A, Bouchet BP, Morel M et al (2015) Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3. *Oncotarget* 6(41) :43557-43570
  20. André F, Michiels S, Dessen P, Scott V, Suciú V, Uzan C et al (2009) Exonic expression profiling of breast cancer and benign lesions: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 10(4):381-390
  21. Fehlbauer P, Guihal C, Bracco L, Cochet O (2005) A microarray configuration to quantify expression levels and relative abundance of splice variants. *Nucleic Acids Res* 33:e47
  22. Reyat F, Stransky N, Bernard-Pierrot I, Vincent-Salomon A, de Rycke Y, Elvin P et al (2005) Visualizing chromosomes as transcriptome correlation maps: evidence of chromosomal domains containing co-expressed genes—a study of 130 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 65:1376-1383
  23. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S (2010) American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 6(4):195-7
  24. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS et al. (2018) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* 36(20):2105-2122
  25. Maire V, Némati F, Richardson M, Vincent-Salomon A, Tesson B, Rigail G et al (2013) Polo-like kinase 1: a potential therapeutic option in combination with conventional chemotherapy for the management of patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 73:816-823
  26. Maire V, Baldeyron C, Richardson M, Tesson B, Vincent-Salomon A, Gravier E et al (2013) TTK/hMPS1 is an attractive therapeutic target for triple-negative breast cancer. *PLoS One* 8:e63712
  27. Lodillinsky C, Infante E, Guichard A, Chaligné R, Fuhrmann L, Cyrta J et al (2016) p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene* 35(3):344-357
  28. Györffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q et al (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 123:725–731
  29. Alexe G, Alexe S, Axelrod DE, Bonates TO, Lozina II, Reiss M et al (2006) Breast cancer prognosis by combinatorial analysis of gene expression data. *Breast Cancer Res* 8(4):R41
  30. Espinosa E, Vara JÁ, Navarro IS, Gámez-Pozo A, Pinto A, Zamora P et al (2011) Gene profiling in breast cancer: time to move forward. *Cancer Treat Rev* 37(6):416-421
  31. Almeida TB, Carnell AJ, Barsukov IL, Berry NG (2017) Targeting SxIP-EB1 interaction: An integrated approach to the discovery of small molecule modulators of dynamic binding sites. *Sci Rep* 7(1):15533

## Legends to Figures

### Figure 1: Combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes improves breast cancer diagnosis

- a- Scattered dot plot of *MAPRE1* probeset (22919.8.1-T\_at) intensity in tumors from patients of cohort #1 (Exonhit) according to tumor malignancy. \*\*p=0.0016.
  - b- Heat-map and hierarchical clustering of 165 breast tumor samples based on the intensities of 6 *MAPRE1* probesets (22919.1.1-T\_at, 22919.1.2-T\_at, 22919.2.1-T\_at, 22919.6.1-T\_at, 22919.7.1-T\_at, 22919.8.1-T\_at). Heat-map illustrates relative expression profiles of *MAPRE1* (column) for each tumor sample (line) in continuous color scale from low (blue) to high (red) expression. Dendrogram of the 2 selected tumor groups and the corresponding scattered dot plot of *MAPRE1* expression are shown on the right.
  - c- Proportion of patients with benign or malignant tumors according to *MAPRE1* level.
  - d- Scattered dot plot of *MTUS1* probeset (57509.5.1-T\_at) intensity in tumors from patients of cohort #1 (Exonhit) according to tumor malignancy. \*\*\*\*p<0.0001.
  - e- Heat-map and hierarchical clustering of 165 breast tumor samples based on the intensities of 6 *MTUS1* probesets (57509.5.1-T\_at, 57509.6.1-T\_at, 57509.10.1-T\_at, 57509.13.1-T\_at, 57509.13.2-T\_at, 57509.26.1-T\_at). Dendrogram of the 2 selected tumor groups and the corresponding scattered dot plot of *MTUS1* expression are shown on the right.
  - f- Proportion of patients with benign or malignant tumors according to *MTUS1* level.
  - g- Proportion of patients with benign or malignant tumors according to combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes.
- a-g- Number of samples in each group is indicated under brackets.

### Figure 2: Combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes correlates with tumor grade

- a- Scattered dot plot of *MAPRE1* probeset (200712\_s\_at) intensity in tumors from patients of exploratory Cohort #2 according to tumor grade (GI, GII, GIII). Median value is indicated by the red line. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.
- b- Heat-map and hierarchical clustering of 150 breast tumor samples based on the intensities of 2 *MAPRE1* probesets (200712\_s\_at, 200713\_s\_at). Dendrogram of the 2 selected tumor groups and the corresponding scattered dot plot of *MAPRE1* expression are shown on the right.

- c- Proportion of patients with Grade I (GI), Grade II (GII) or Grade III (GIII) tumors according to *MAPRE1* level.
  - d- Scattered dot plot of *MAPRE1* probeset (200712\_s\_at, upper panel) and *MTUS1* probeset (212093\_s\_at, lower panel) intensities in tumors classified in 4 clusters of either low or high level of *MAPRE1* and *MTUS1* transcripts.
  - e- Proportion of patients with Grade I (GI), Grade II (GII) or Grade III (GIII) tumors according to combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* in the four clusters.
  - f- Proportion of patients in clusters 1 to 4 according to tumor grade (GI, GII, GIII).
- a-f- Number of samples is indicated under brackets.

**Figure 3: Combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* genes improves breast cancer prognosis**

- a- Overall survival curves for patients from exploratory Cohort #2, with tumors expressing low or high *MAPRE1* levels, relative to the dendrogram in Fig2b.
  - b- Overall survival curves for patients from exploratory Cohort #2, with tumors expressing low or high *MAPRE1* and *MTUS1* levels, according to clusters 1 to 4 defined in Fig.2d.
  - c- Relapse-free survival curves for patients from exploratory Cohort #2, with tumors expressing low or high *MAPRE1* and *MTUS1* levels as in (b).
  - d- Proportion of patients remaining alive after 5 years with tumors expressing low or high *MAPRE1* and *MTUS1* levels as in (b).
  - e- Representative images of EB1 staining on breast tumor Tissue MicroArray (TMA) using anti-EB1 monoclonal antibody. Numbers on the right upper corner of each image indicate intensity of the EB1 staining from weak (<1-1) to strong EB1 expression (2-3). A bar represents 50  $\mu$ m.
  - f- Overall survival curves for patients from TMA with tumors expressing weak or strong EB1 levels, relative to IHC classification.
  - g- Representative images of IHC on breast tumor Tissue MicroArray (TMA) using anti-EB1 (left) or anti-ATIP3 (right) antibodies showing weak and strong immunostaining. A bar represents 100  $\mu$ m.
  - h- Overall survival curves for patients from TMA, with tumors expressing weak or strong EB1 and ATIP3 levels according to IHC classification.
- a-h- Number of tumors in each group is indicated under brackets.

## Legends to Tables

### **Table 1. Characteristics of patients from Cohort#1, with high or low *MAPRE1*, *MTUS1* or combinatorial genes expression**

Low and high *MAPRE1* and *MTUS1* levels were determined according to heatmap analysis of Exonhit probesets intensities. Tumors of Cluster 3 expressing high-*MAPRE1* and low-*MTUS1* were compared to tumors of all other clusters.

### **Table 2. Characteristics of patients from Cohort #2, with high or low *MAPRE1* or *MAPRE1/MTUS1* combinatorial genes expression**

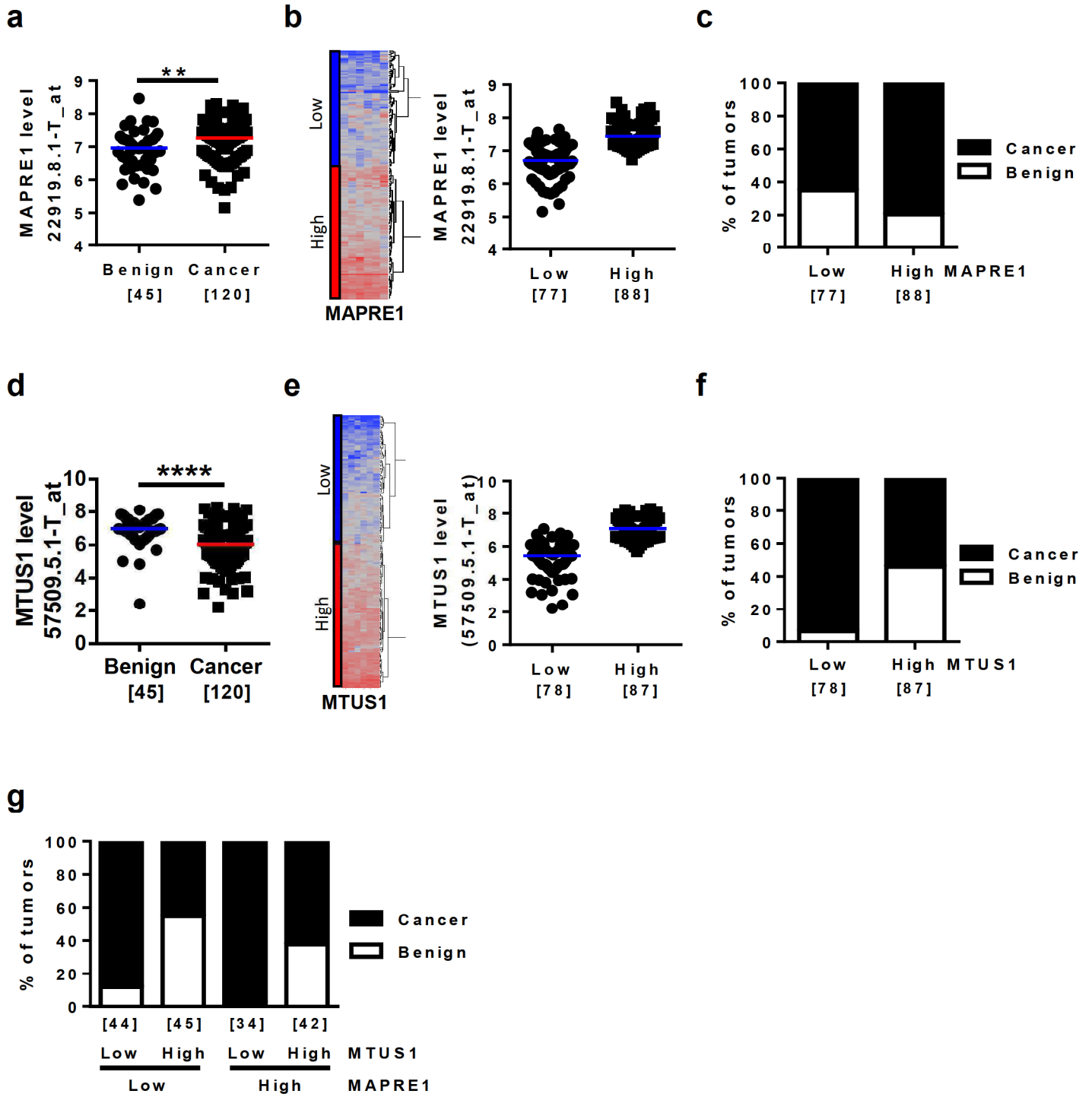
Low and high *MAPRE1* levels were determined according to heatmap analysis of Affymetrix probesets intensities. Tumors of Cluster 3 expressing high-*MAPRE1* and low-*MTUS1* were compared to tumors of all other clusters.

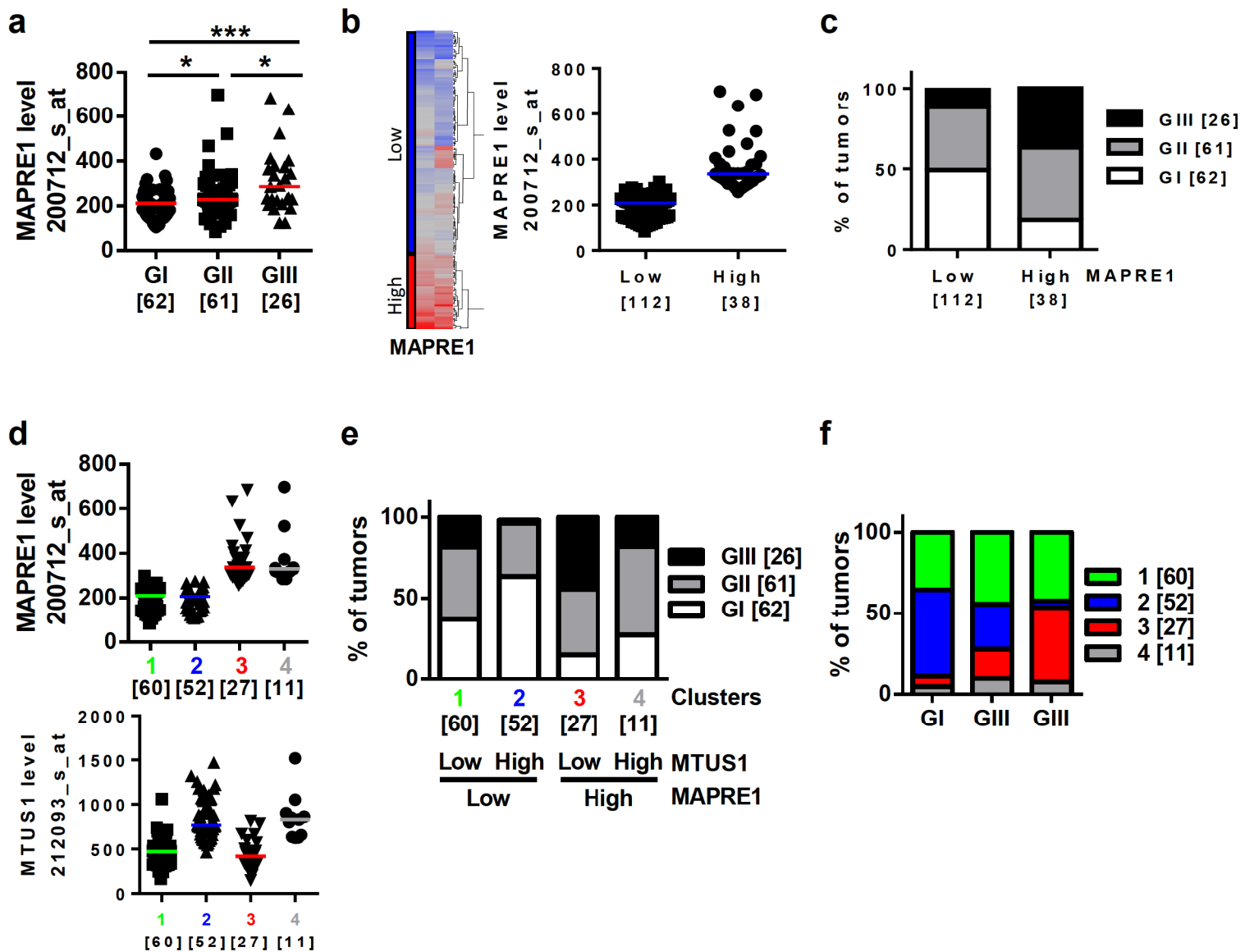
### **Table 3. Univariate and multivariate analysis of the correlation between clinical parameters, *MAPRE1* and *MTUS1* levels, and survival time of patients from Cohort#2**

A star indicates multivariate analysis including *MAPRE1/MTUS1* combination. HR: Hazard Ratio; CI: Confidence Interval; p: p-value; p-values that reach significance are in bold.

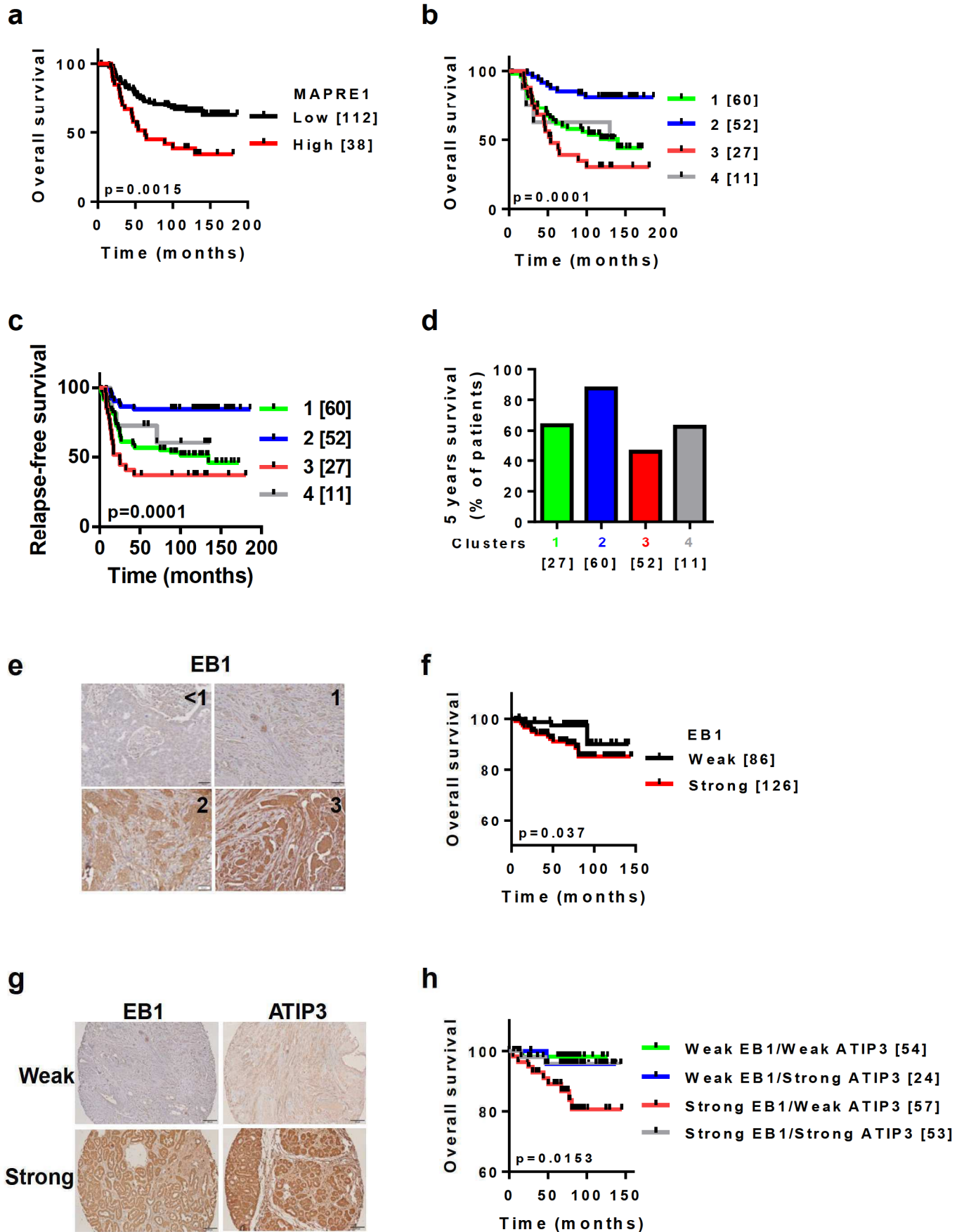
### **Table 4. Characteristics of patients included in Tissue Microarray analysis, with strong or weak expression of EB1 or EB1/ATIP combinations.**

Weak and strong EB1 and ATIP3 levels were scored by IHC as indicated in the Methods. Tumors classified as strong-EB1 and weak-ATIP3 were compared to tumors of all other groups.









Rodrigues-Ferreira et al. Figure 3

Variables	MAPRE1		MTUS1		Combined MAPRE1/MTUS1			p value
	All N=165	Low N=77 (46.7%)	High N=88 (53.3%)	Low N=78 (47.3%)	High N=87 (52.7%)	cluster 3 N=43 (26.1%)	other clusters N=122 (73.9%)	
Benign	45 (27.3%)	27 (35.1%)	18 (20.4%)	5 (6.4%)	40 (46%)	1 (2.3%)	44 (36.1%)	<0.0001
Cancer	120 (72.7%)	50 (64.9%)	70 (79.6%)	73 (93.6%)	47 (54%)	42 (97.7%)	78 (63.9%)	

**Table 1. Characteristics of patients from Cohort#1 with high or low MAPRE1, MTUS1 or combined genes expression**

Low and high MAPRE1 and MTUS1 levels were determined according to heatmap analysis of probesets intensities.

Tumors of Cluster 3 expressing high-MAPRE1 and low-MTUS1 were compared to tumors of all other clusters

Variables		All N=150	MAPRE1		p value	Combined MAPRE1/MTUS1		p value
			Low N=112 (74.7%)	High N=38 (25.3%)		cluster 3 N =27 (18%)	other clusters N=123 (82%)	
ER	pos	119 (79.3%)	93 (83%)	26 (68.4%)	0.153	19 (70.4%)	100 (81.3%)	0.419
	neg	28 (18.7%)	17 (15.2%)	11 (28.9%)		7 (25.9%)	21 (17.1%)	
	missing	3 (2%)	2 (1.8%)	1 (2.6%)		1 (3.7%)	2 (1.6%)	
PR	pos	82 (54.7%)	67 (59.8%)	15 (39.5%)	0.0712	10 (37%)	72 (58.5%)	0.121
	neg	63 (42%)	41 (36.6%)	22 (57.9%)		16 (59.3%)	47 (38.2%)	
	missing	5 (3.3%)	4 (3.6%)	1 (2.6%)		1 (3.7%)	4 (3.3%)	
HER2	pos	21 (14.1%)	14 (12.5%)	7 (18.9%)	0.12	5 (18.5%)	16 (13.1%)	0.161
	neg	105 (70.5%)	77 (68.7%)	28 (75.7%)		21 (77.8%)	84 (68.9%)	
	missing	23 (15.4%)	21 (18.8%)	2 (5.4%)		1 (3.7%)	22 (18%)	
Grade	I	62 (41.3%)	55 (49.1%)	7 (18.4%)	0.0004	4 (14.8%)	58 (47.2%)	0.0002
	II	61 (40.7%)	44 (39.3%)	17 (44.7%)		11 (40.7%)	50 (40.6%)	
	III	26 (17.3%)	12 (10.7%)	14 (36.8%)		12 (44.4%)	14 (11.4%)	
	missing	1 (0.67%)	1 (0.67%)				1 (0.8%)	
recurrence	no	91 (60.7%)	74 (66.1%)	17 (44.7%)	0.02	10 (37%)	81 (65.9%)	0.0055
	yes	59 (39.3%)	38 (33.9%)	21 (55.3%)		17 (63%)	42 (34.1%)	
death	no	77 (51.3%)	65 (58%)	12 (31.6%)	0.015	8 (29.6%)	69 (56.1%)	0.0097
	yes	56 (37.3%)	35 (31.3%)	21 (55.3%)		17 (62.9%)	39 (31.7%)	
	missing	17 (11.3%)	12 (10.7%)	5 (13.2%)		2 (7.4%)	15 (12.2%)	
5-years survival	no	41 (27.3%)	25 (22.3%)	16 (42.1%)	0.0228	13 (48.15%)	28 (22.8%)	0.0248
	yes	91 (60.7%)	75 (67%)	16 (42.1%)		11 (40.7%)	80 (65%)	
	missing	18 (12%)	12 (10.7%)	6 (15.8%)		3 (11.1%)	15 (12.2%)	

**Table 2. Characteristics of patients from Cohort#2 with high or low MAPRE1 or combined MAPRE1/MTUS1 genes expression**

Low and high MAPRE1 and MTUS1 levels were determined according to heatmap analysis of probesets intensities.

Tumors of Cluster 3 expressing high-MAPRE1 and low-MTUS1 were compared to tumors of all other clusters

	Univariate Analysis			Multivariate Analysis			Multivariate Analysis*		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
ER - vs +	3.2	1.64-6.2	<b>0.0003</b>	1.89	0.81-4.36	0.068	1.9	0.83-4.3	0.062
PR - vs +	2.2	1.23-3.9	<b>0.0036</b>	1.5	0.59-3.78	0.195	1.5	0.59-3.78	0.195
HER2 + vs -	2.8	1.31-5.94	<b>0.0036</b>	1.73	0.67-4.45	0.128	1.67	0.61-4.55	0.158
Grade III vs I/II	4.1	1.95-8.6	<b>&lt;0.0001</b>	2.00	0.86-4.6	0.051	1.98	0.86-4.57	0.055
MAPRE1 high vs low	2.22	1.19-4.12	<b>0.0058</b>	1.4	0.40-4.89	0.299			
MTUS1 low vs high	3.07	1.7-5.5	<b>0.0001</b>	2.7	1.34-5.42	<b>0.0018</b>			
MAPRE1 MTUS1 combination cluster 3 vs 2	5.46	2.12-13.97	<b>0.0002</b>				3.5	1.12-10.85	<b>0.015</b>

**Table 3. Univariate and multivariate analysis of the correlation between clinicopathological parameters, MAPRE1 and MTUS1 level, and survival time of patients from Cohort**

\* multivariate analysis including MAPRE1/MTUS1 combination

HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Interval, p: p-value

p-values that reach significance are in bold

Variables	EB1			Combined EB1/ATIP3			p value
	All N=212	Weak N=86 (40,6%)	Strong N=126 (59,4%)	All N=194	Strong EB1/Weak ATIP3 N =59 (30,4%)	other groups N=135 (69,6%)	
ER	pos	154 (72,6%)	63 (73,3%)	91 (72,2%)	46 (78%)	95 (70,4%)	0,247
	neg	58 (27,4%)	23 (26,7%)	35 (27,8%)	13 (22%)	40 (29,6%)	
Grade	I	38 (17,9%)	19 (22,1%)	19 (15,1%)	11 (18,6%)	21 (15,6%)	0,847
	II	76 (35,9%)	33 (38,4%)	43 (34,1%)	21 (35,6%)	52 (38,5%)	
	III	98 (46,2%)	34 (39,5%)	64 (50,8%)	89 (45,9%)	62 (45,9%)	
death	no	187 (88,2%)	80 (93%)	107 (84,9%)	48 (81,4%)	127 (94,1%)	<b>0,0067</b>
	yes	17 (8%)	3 (3,5%)	14 (11,1%)	9 (15,3%)	4 (3%)	
	missing	8 (3,8%)	3 (3,5%)	5 (4%)	6 (3,1%)	4 (3%)	

**Table 4. Characteristics of patients from TMA, with weak or strong immunostaining of EB1 or combined EB1/ATIP3**

Weak and strong EB1 and ATIP3 levels were scored by IHC as indicated in the Methods

Tumors classified as strong-EB1 and weak-ATIP3 were compared to tumors of all other groups.

## **Combinatorial expression of microtubule-associated EB1 and ATIP3 biomarkers improves breast cancer prognosis**

**Sylvie RODRIGUES-FERREIRA et al.**

# corresponding author. Gustave Roussy Cancer Center, Dept of Molecular Medicine, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France. Email : clara.nahmias@inserm.fr

### **Supplemental Materials and Methods**

#### **Breast cancer patients cohorts and Gene arrays**

Cohort#3 comprises a series of 130 invasive breast cancer samples from patients diagnosed between 1999 and 2008 and treated at the Curie Hospital (Biological Resource Center, Paris, France), and 11 healthy samples obtained from mammary plastic surgery [25, 26]. Patients were aged 27 to 89 and were treated with chemotherapy combined or not with radio and/or hormonotherapy after surgical resection of the tumor. Total RNA from frozen tumor samples were extracted and purified before hybridization on Affymetrix U133 plus 2.0 chips. Normalized transcriptomic data for *MAPRE1* and *MTUS1* genes were extracted and analyzed, then compared with clinical data.

Cohort#4 comprises 155 invasive breast carcinomas from patients included in the prospective database of the Institut Gustave Roussy (IGR, Villejuif, France) between 1984 and 1994 as described [18]. Patients included in the study were aged 28 to 87 and were treated by radio- and/or hormonotherapy after tumor resection. Total RNA from frozen tumor samples were extracted and purified before hybridization on Agilent Human 244k ExonV3 array. Gene expression data have been submitted to the Array Express data repository at the European Bioinformatics Institute (Saffron Walden, UK; <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under accession number E-MTAB-1389.

*MAPRE1* gene expression in a meta-analysis of 1,402 patients with breast cancer with known clinical outcome was retrieved from Kaplan–Meier plotter database <http://www.kmplot.com> [28].

## **Legends to Supplemental figures**

### **Supplemental Figure S1**

Scattered dot plot of *MAPRE1* probesets (22919.1.1-T\_at, 22919.1.2-T\_at, 22919.2.1-T\_at, 22919.6.1-T\_at, 22919.7.1-T\_at) intensities in tumors from patients of Cohort #1 according to tumor malignancy (Benign versus Cancer). Number of samples is indicated under brackets. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### **Supplemental Figure S2**

a- Scattered dot plot of *MAPRE2* probesets (10982.1.1-T\_at, 10982.1.2-T\_at, 10982.2.1-T\_at, 10982.2.2-T\_at, 10982.3.1-T\_at, 10982.5.1-T\_at) in tumors from patients of Cohort #1 according to tumor malignancy (Benign versus Cancer). Number of samples is indicated under brackets. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

b- Same legend as in (a) for *MAPRE3* probesets (22924.1.1-T\_at, 22924.2.1-T\_at, 22924.3.1-T\_at, 22924.4.1-T\_at, 22924.5.1-T\_at, 22924.6.1-T\_at) intensities.

### **Supplemental Figure S3**

Scattered dot plot of *MTUS1* probesets (57509.6.1-T\_at, 57509.10.1-T\_at, 57509.13.1-T\_at, 57509.13.2-T\_at, 57509.26.1-T\_at) intensities in tumors from patients of Cohort #1 according

to tumor malignancy (Benign versus Cancer). Number of samples is indicated under brackets.  
\*\*\*\*p<0.0001.

#### Supplemental Figure S4

- a- Scattered dot plot of *MAPRE1* levels in normal tissue and tumors from patients of Cohort #3 classified according to tumor grade (GI/II, GIII). \*\*\*\*p<0.0001.
- b- Heat-map and hierarchical clustering of 130 breast tumor samples of Cohort #3 based on *MAPRE1* probeset intensity. Dendrogram of the 2 selected tumor groups and the corresponding scattered dot plot of *MAPRE1* expression are shown on the right.
- c- Proportion of patients with Grade I/II and Grade III (GIII) tumors in Cohort #3 according to *MAPRE1* level.
- d- Scattered dot plot of *MAPRE1* levels in tumors from patients of Cohort #4 according to tumor grade (GI, GII, GIII). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.
- e- Heat-map and hierarchical clustering of 155 breast tumor samples from Cohort #4 based on the intensities of 9 *MAPRE1* probesets. Dendrogram of the 2 selected tumor groups and the corresponding scattered dot plot of *MAPRE1* expression are shown on the right.
- f- Proportion of patients with Grade I, Grade II and Grade III tumors in Cohort #4 according to *MAPRE1* level.
- g- Scattered dot plot of *MAPRE1* levels in tumors from patients of Cohort # 2 according to presence (ER+) or absence (ER-) of estrogen receptor. On the right, proportion of patients with ER+ or ER- tumors according to *MAPRE1* level.
- h- Same as (g) in Cohort #4.
- i- Same as (g) and (h) in Cohort #3.
- a-i- Number of samples is under brackets.



### Supplemental Figure S5

- a- Scattered dot plot of *MAPRE3* probesets intensities in tumors from patients of Cohort #2, according to tumor grade (GI, GII, GIII).
  - b- Scattered dot plot of *MAPRE2* probeset intensities in normal tissue and tumors from Cohort #3, according to tumor grade (GI/II, GIII).
  - c- Scattered dot plot of *MAPRE2* and *MAPRE3* probeset intensities in tumors from Cohort #4, according to tumor grade (GI, GII, GIII).
- a-c- Number of samples is indicated under brackets. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### Supplemental Figure S6

- a- Heat-map and hierarchical clustering of 130 breast tumor samples (Cohort #3) based on the intensities of *MTUS1* probeset. Dendrogram of the 2 selected tumor groups and the corresponding scattered dot plot of *MTUS1* expression are shown on the right.
- b- Scattered dot plot of *MAPRE1* probeset (left) and *MTUS1* probeset (right) intensities in tumors from Cohort#3 classified in 4 clusters of either low or high level of *MAPRE1* and *MTUS1* transcripts.
- c- Proportion of patients with Grade I (GI), Grade II (GII) or Grade III (GIII) tumors from Cohort#3 according to combinatorial expression of *MAPRE1* and *MTUS1* in the four clusters.
- d- Proportion of patients with clusters 1 to 4 tumors from Cohort#3 according tumor grade (GI, GII, GIII).
- e- Same as (a) for tumors from Cohort #4.
- f- Same as (b) for tumors from Cohort #4.
- g- Same as (c) for tumors from Cohort #4.

h- Same as (d) for tumors from Cohort #4.

a-h- Number of samples is under brackets.

### Supplemental Figure S7

- a- Overall survival curves from patients with breast tumors expressing Low (black line) or High (red line) *MAPRE1* level using Kaplan-Meier plotter (<http://www.kmplot.com>). All percentiles between the lower and the upper quartiles were automatically computed, and the best performing threshold was used as a cut off.
- b- Relapse-free survival curves from patients with breast tumors expressing Low (black line) or High (red line) *MAPRE1* level using Kaplan-Meier plotter (<http://www.kmplot.com>).
- c- Overall survival curves for patients from Cohort #3, with tumors expressing low or high *MAPRE1* and *MTUS1* levels, according to clusters 1 to 4. Number of tumors in each group is indicated under brackets.
- d- Disease-free survival curves for patients from the Cohort #3, as in (c).
- e- Western blot analysis of HeLa cells silenced (siEB1) or not (siCtrl) for EB1 by siRNA. Blots were probed using anti-EB1 antibody and reprobed using anti-tubulin antibody for loading control. Right panel: Representative images of corresponding cytoblocks stained with anti-EB1 antibody diluted 1:300.
- f- Representative images of IHC performed on a normal breast section (left) and a grade-III breast cancer section (right) using anti-EB1 antibody. A bar represents 50  $\mu$ m.

## **Legends to Supplemental Tables**

**Supplemental Table S1.** Characteristics of patients from Cohort#1 with clinical parameters, probesets intensities and clusters of tumors. Data are from [20].

**Supplemental Table S2.** Characteristics of patients from Cohort#2 with clinical parameters, probesets intensities and clusters. Data are from [17].

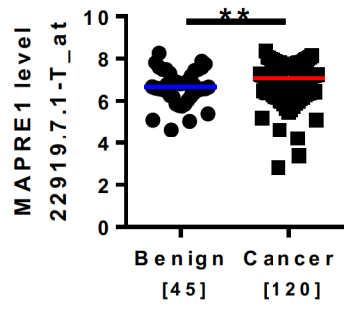
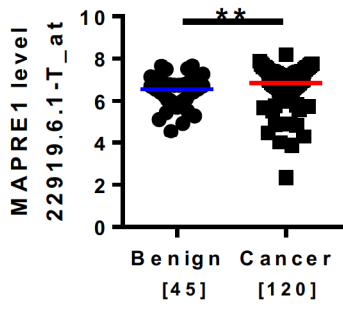
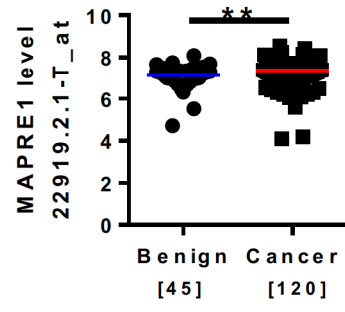
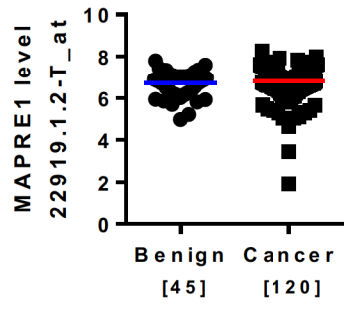
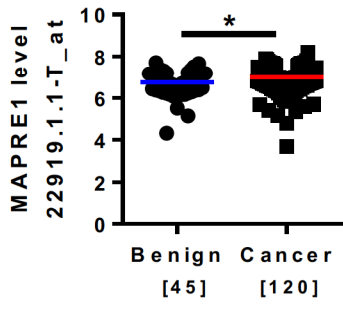
**Supplemental Table S3.** Characteristics of patients from Cohort#3 with clinical parameters, probesets intensities and clusters. Data are from [25, 26].

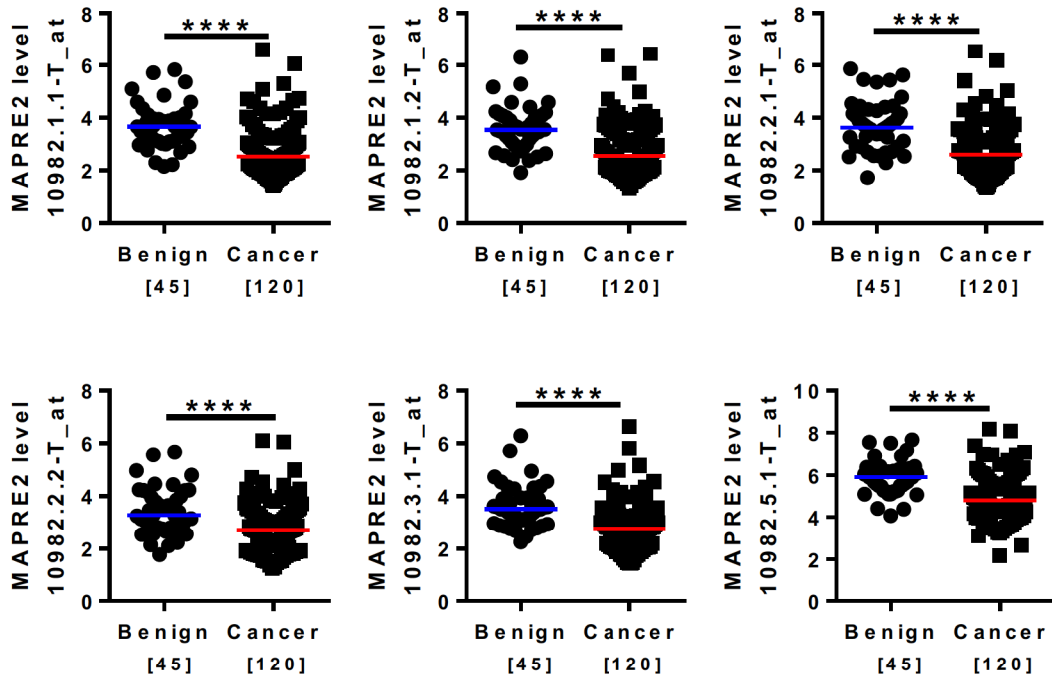
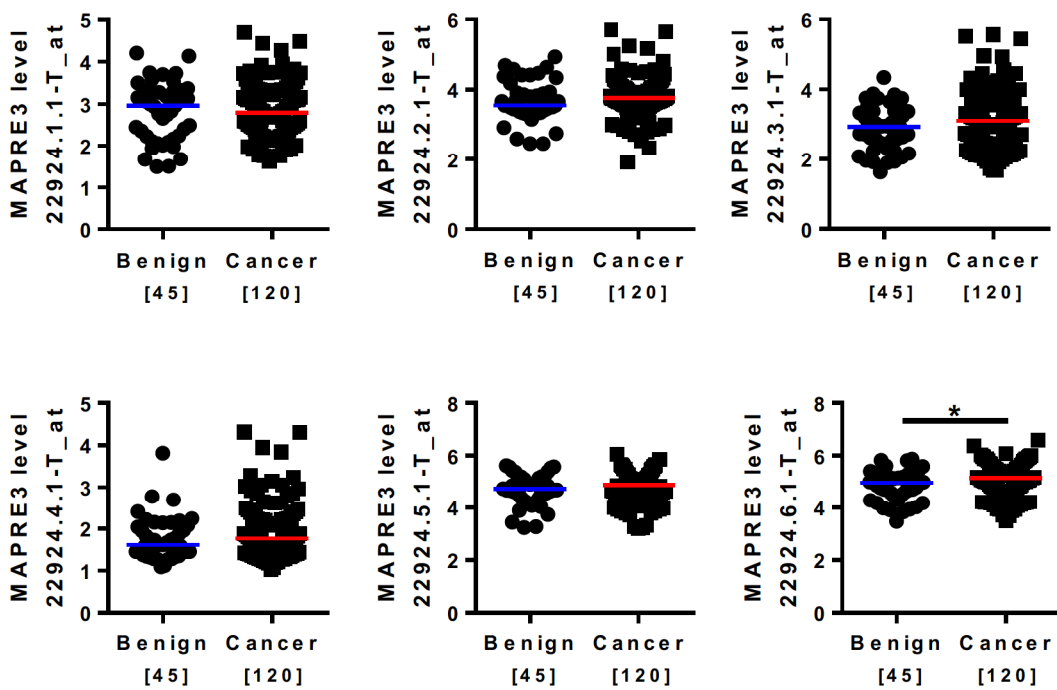
**Supplemental Table S4.** Characteristics of patients from Cohort#4 with clinical parameters, probesets intensities and clusters. Data are from [18].

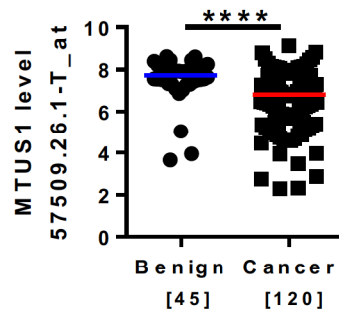
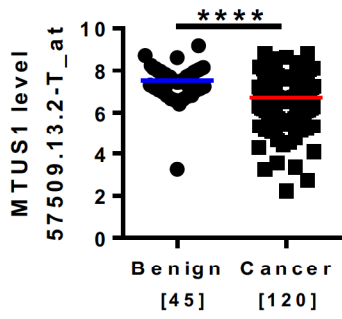
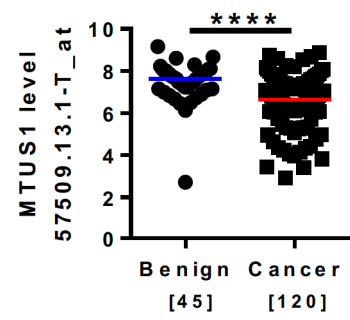
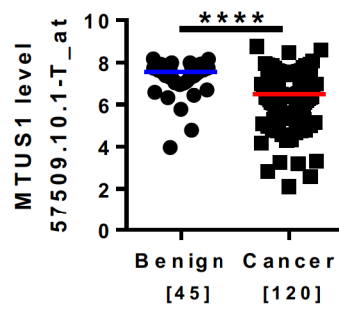
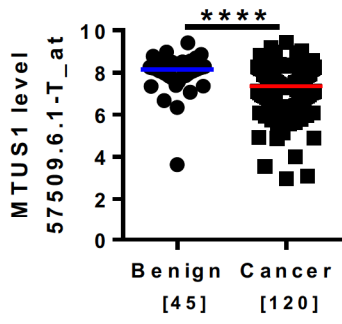
**Supplemental Table S5.** Characteristics of patients from TMA with clinical parameters, IHC immunostaining intensities and EB1/ATIP3 levels

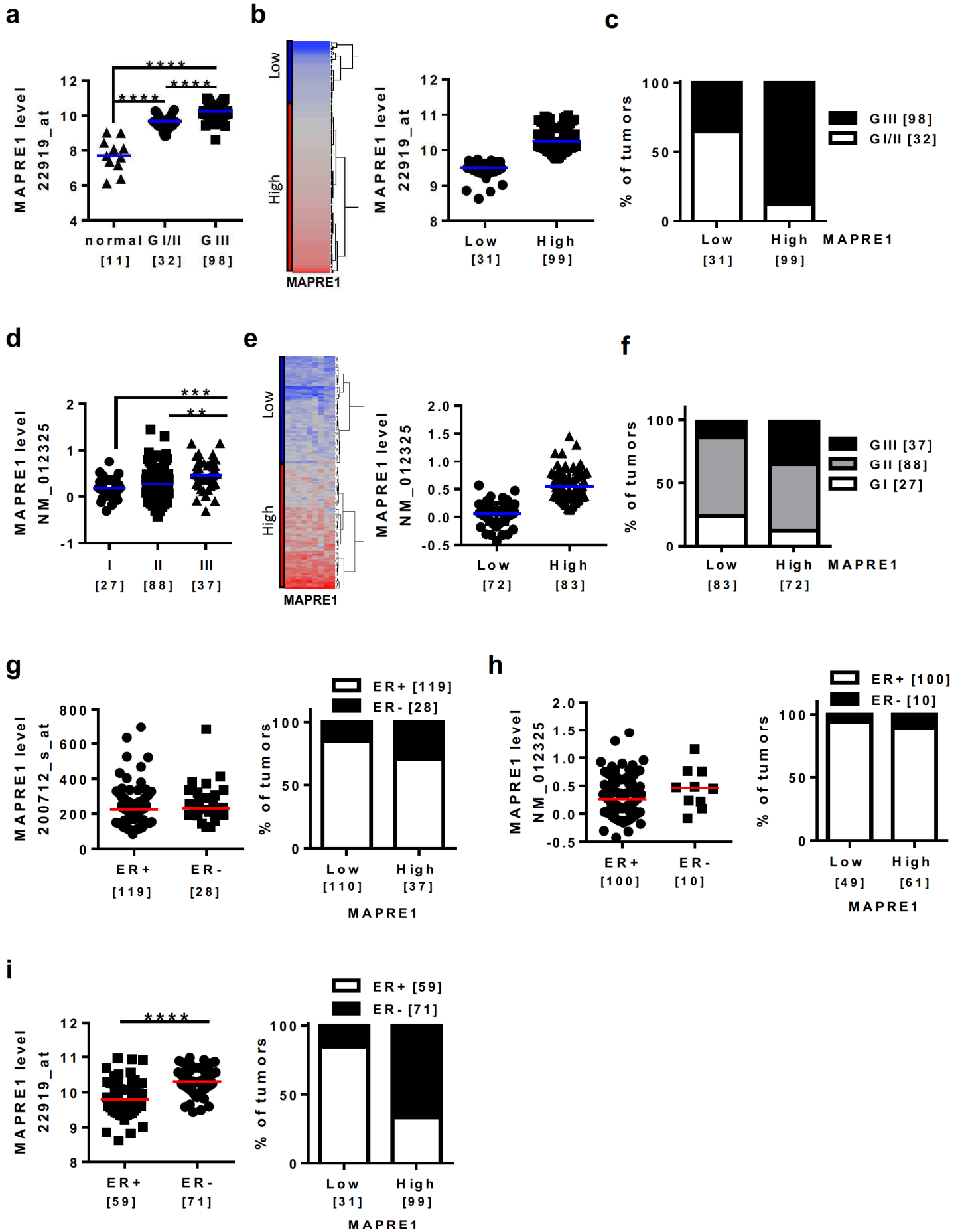
**Supplemental Table S6.** Characteristics of patients from Cohort#3, with high or low *MAPRE1* and combinatorial *MAPRE1-MTUS1* expression. Low and high *MAPRE1* and *MTUS1* levels were determined according to heatmap analysis of probesets intensities. Tumors of Cluster 3 expressing high-*MAPRE1* and low-*MTUS1* were compared to tumors of all other clusters.

**Supplemental Table S7.** Characteristics of patients from Cohort#4, with high or low *MAPRE1* and combinatorial *MAPRE1-MTUS1* expression. Same legend as Suppl Table S6.

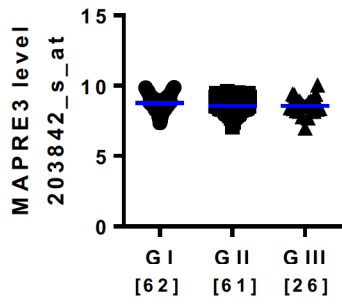


**a****b**

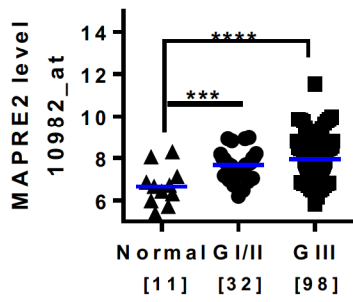




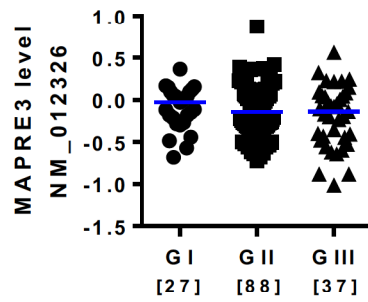
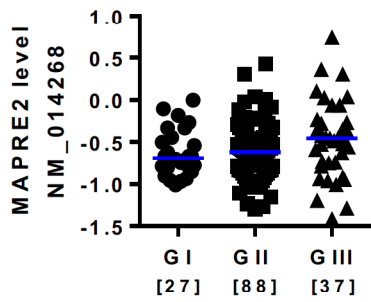
**a**



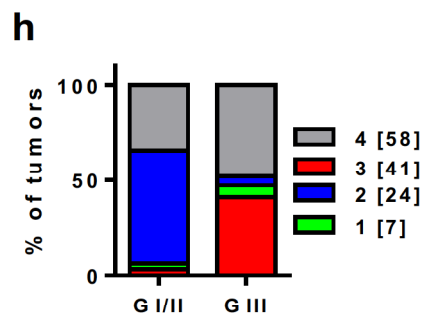
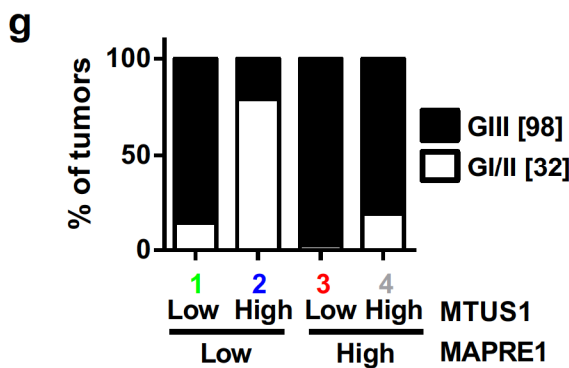
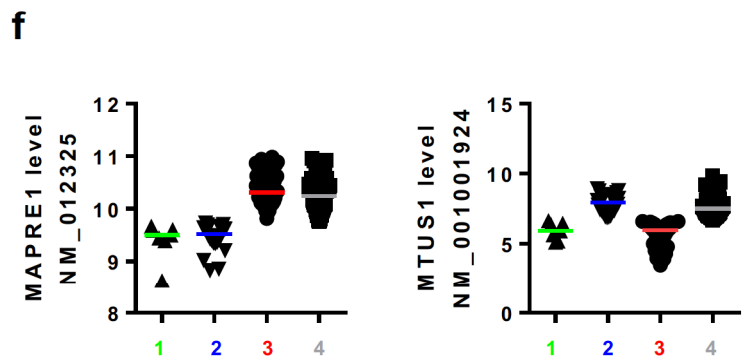
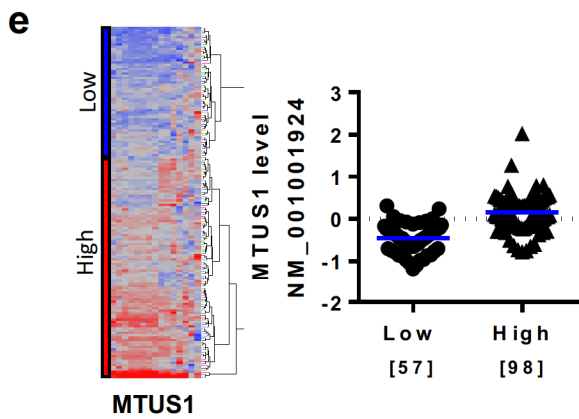
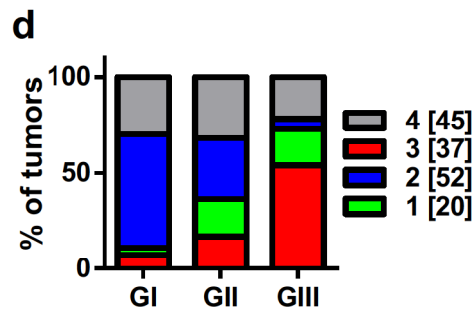
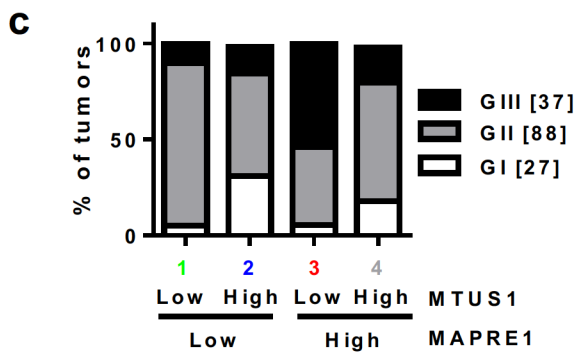
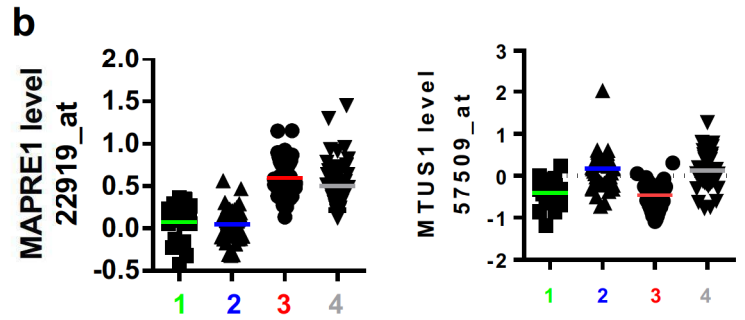
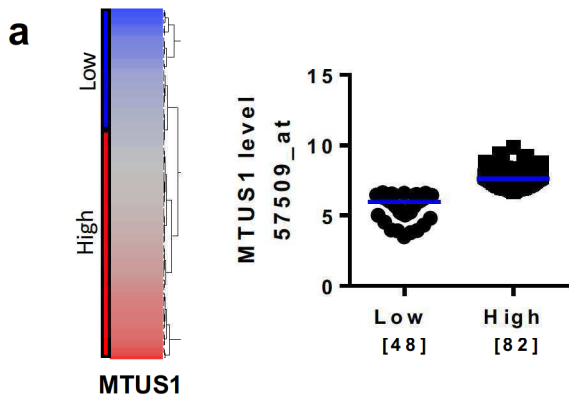
**b**

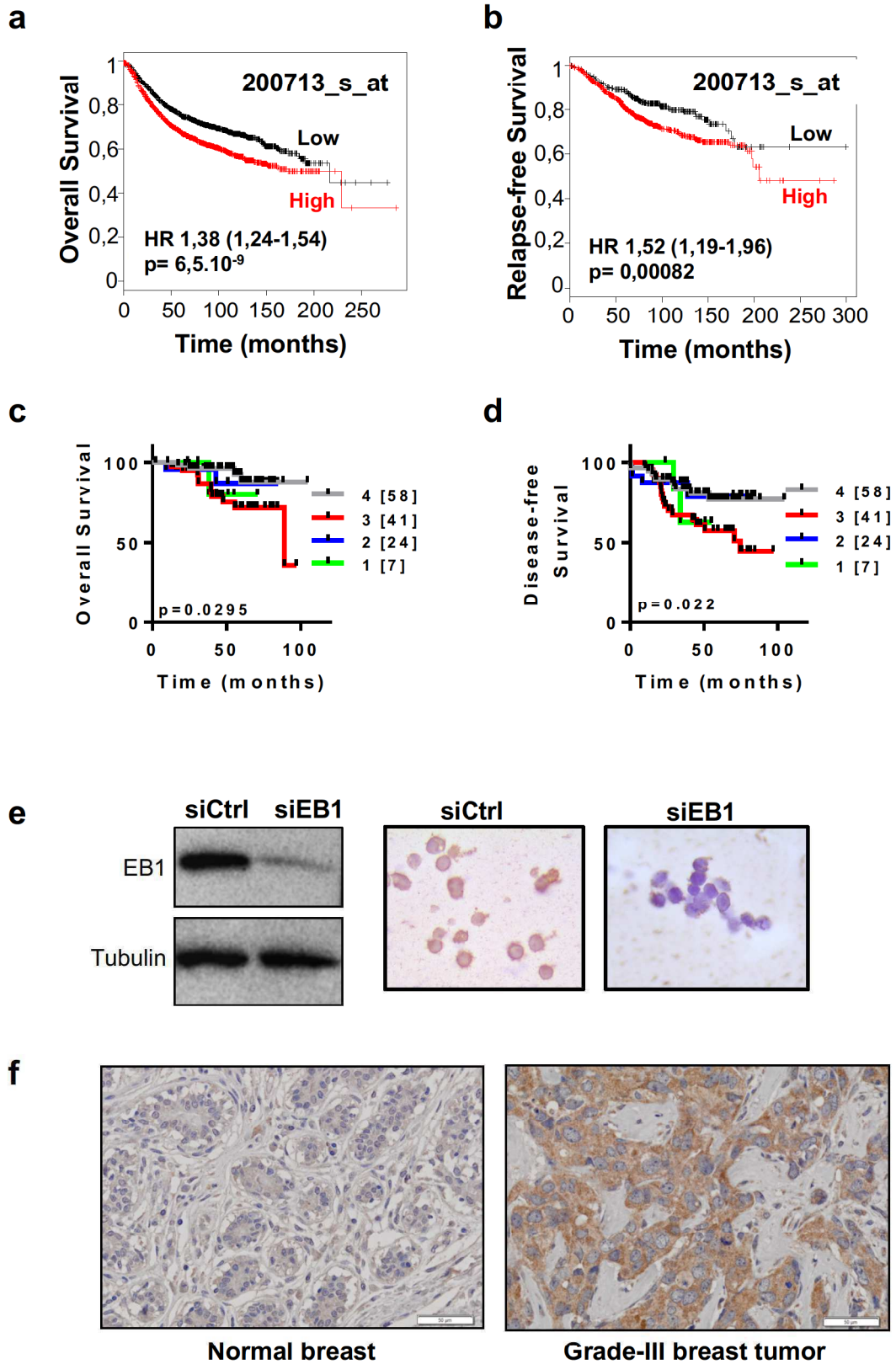


**c**











4. ARTICLE 4:

**Microtubule-associated protein ATIP3 interacts with Kif2A and Dda3 to maintain metaphase spindle length through Aurora A kinase activity**

Nehlig A, Seiler C, Dingli F, Arras G, Loew D, Prigent C, Nahmias C

(2018)

Les travaux antérieurs de notre équipe ont démontré qu'ATIP3 était une MAP codée par un gène suppresseur de tumeur dont l'expression est fortement diminuée dans les tumeurs du sein les plus agressives. ATIP3 présente des effets anti-tumoraux et anti-métastatiques faisant d'elle une bonne cible thérapeutique. Alors que les études de notre groupe au cours de ces dernières années se sont focalisées sur les aspects moléculaires d'ATIP3 en interphase, cette étude explore le rôle de cette protéine en mitose. En effet, ATIP3 s'associe avec le fuseau mitotique et les pôles, cependant le rôle d'ATIP3 dans la division cellulaire reste méconnu.

Nous avons pu montrer qu'une déplétion d'ATIP3 engendre des défauts de mitose en métaphase incluant une taille réduite du fuseau. Le contrôle de la taille du fuseau mitotique en métaphase est crucial pour assurer une bonne division cellulaire. En effet, une anomalie de la taille du fuseau peut induire une mauvaise ségrégation des chromosomes dans les deux cellules filles et engendrer une instabilité chromosomique et de l'aneuploïdie. En parallèle, une approche protéomique a permis d'identifier 145 partenaires d'interaction potentiels d'ATIP3, incluant la kinésine Kif2A, dotée d'une activité de dépolymérisation des microtubules (MTs) qu'elle exerce au pôle du fuseau pour réguler sa taille. L'interaction ATIP3-Kif2A a été validée et caractérisée. En plus d'interagir avec, ATIP3 co-localise avec Kif2A aux pôles du fuseau mitotique, où elle diminue son recrutement sans modifier ses niveaux d'expression. L'utilisation de mutants d'ATIP3 incapables d'interagir avec Kif2A a montré que l'interaction ATIP3-Kif2A était impliquée dans le contrôle de la taille du fuseau. Kif2A est connue pour être recrutée par Dda3, une protéine associée aux microtubules et nous avons démontré que le recrutement de Kif2A par Dda3 au pôle est fonctionnellement impliqué dans la régulation de la taille du fuseau par ATIP3. De façon intéressante, ATIP3 interagit aussi avec Dda3 et une déplétion de Dda3 empêche l'interaction ATIP3-Kif2A indiquant que Dda3 est nécessaire à cette interaction, ce qui suggère l'existence d'un complexe ATIP3-Kif2A-Dda3. De façon similaire à Kif2A, ATIP3 diminue le recrutement de Dda3 mais diminue également ses niveaux d'expression, suggérant qu'ATIP3 contrôle la stabilité de Dda3. Il est à noter qu'à l'inverse la déplétion de Kif2A ou de Dda3 n'a aucun effet sur la localisation d'ATIP3 au pôle, indiquant qu'ATIP3 est un régulateur majeur du complexe Kif2A-Dda3. Nous avons ensuite mis en évidence que le complexe ATIP3-Kif2A-Dda3 était augmenté en mitose et que sa stabilisation nécessitait une phosphorylation par la kinase Aurora A (AurKA). Il est

à noter qu'une déplétion d'AurKA mime les effets d'ATIP3, c'est-à-dire une réduction de la taille du fuseau et une augmentation de l'intensité de Kif2A au pôle. De façon intéressante, une perte ou une inhibition d'AurKA décroît l'intensité d'ATIP3 au pôle indiquant que la localisation d'ATIP3 est régulée par l'activité d'AurKA. A l'inverse, une déplétion d'ATIP3 diminue l'intensité d'AurKA et de sa forme phosphorylée au pôle, montrant l'existence d'une régulation réciproque d'AurKA et d'ATIP3. De façon importante, AurKA restaure les effets d'une perte d'ATIP3 sur la taille du fuseau tandis que son mutant inactif d'AurKA est inefficace indiquant que l'activité d'AurKA est donc nécessaire pour restaurer les effets d'une déplétion d'ATIP3. Cette boucle de régulation positive entre ATIP3, un suppresseur de tumeur et AurKA, décrit comme un oncogène, soulève un paradoxe, qui sera traité dans la discussion.

Etant donné qu'ATIP3 et Dda3 sont toutes les deux connues pour être des partenaires d'interaction d'EB1, et qu'ATIP3 interagit avec Kif2A et EB1 via le même domaine (CN), j'ai cherché à évaluer l'implication d'EB1 dans le complexe ATIP3-Kif2A-Dda3 et dans les effets d'ATIP3 dans des expériences supplémentaires. Mes études ont montré qu'une déplétion d'EB1 augmente les interactions ATIP3-Kif2A et ATIP3-Dda3, indiquant une compétition entre EB1 et le complexe Kif2A-Dda3 pour interagir avec ATIP3. Cependant, l'extinction d'EB1 diminue la taille du fuseau mitotique mais n'a pas d'effet sur le phénotype de la déplétion d'ATIP3 sur la taille du fuseau. L'effet d'une surexpression d'EB1 serait à explorer pour connaître son implication dans ce phénotype. Ces résultats ne font pas partie de l'article scientifique et sont présentés en figure supplémentaire (**Figure S5**) de ce manuscrit de thèse.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats a mis en évidence l'existence d'un complexe ATIP3-Kif2A-Dda3 stabilisé par l'activité d'AurKA, qui est également nécessaire à la localisation d'ATIP3 au pôle. Réciproquement, ATIP3 contribue également au recrutement d'AurKA au pôle. En interagissant avec Kif2A et Dda3, ATIP3 empêche leur recrutement et par conséquent contrôle l'activité de dépolymérisation des MTs au pôle et permet le maintien d'une taille correcte du fuseau mitotique. En absence d'ATIP3, le frein exercé sur Kif2A et Dda3 est levé, le complexe Kif2A/Dda3 peut donc s'accumuler au pôle. De plus, la localisation d'AurKA est diminuée, ce qui augmente aussi le recrutement de Kif2A. Ces deux actions résultent en une augmentation de l'activité de dépolymérisation de Kif2A, ce qui contribue à la réduction du fuseau mitotique.

**Microtubule-associated protein ATIP3 interacts with Kif2A and Dda3 to maintain metaphase spindle length through Aurora A kinase activity**

Anne NEHLIG<sup>1</sup>, Cynthia SEILER<sup>1</sup>, Florent DINGLI<sup>2</sup>, Guillaume ARRAS<sup>2</sup>, Damarys LOEW<sup>2</sup>, Claude PRIGENT<sup>3</sup> and Clara NAHMIA<sup>1</sup>

1. Inserm U981, Institut Gustave Roussy Department of Molecular Medicine, Université Paris-Saclay, 94800 Villejuif, France.
2. Institut Curie, PSL Research University, Centre de Recherche, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique, 26 rue d'Ulm, Paris 75248 Cedex 05, France.
3. Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), Unité CNRS UMR 6290, Université de Rennes, 2 Avenue du Professeur Leon Bernard 35043 Rennes, France

**Contact information:** Dr Clara Nahmias, Inserm U981, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif. Email : [clara.nahmias@inserm.fr](mailto:clara.nahmias@inserm.fr)  
Tel : (+33) 682 00 69 33

**Keywords :** ATIP3, Kif2A, Dda3, AurKA, mitotic spindle

**Included :** 7 Figures, 4 Supplementary Figures, 1 Table, 1 Supplementary Table

## ABSTRACT

The control of mitotic spindle length in metaphase is crucial for normal cell division and prevention of aneuploidy and chromosomal instability, which are hallmarks of cancer. The minus-end MT depolymerizing kinesin Kif2A and its partner Dda3 (also known as PSRC1) are involved in control of spindle length in metaphase. Aurora Kinase A phosphorylates Kif2A and Dda3 but how AurKA regulates Kif2A/Dda3 complex remains unclear. We show here that depletion of microtubule-associated tumor suppressor ATIP3 reduces spindle length. Proteomic analyses (ProteomeXchange identifier PXD009182) identified Kif2A as a major partner of ATIP3. We show that ATIP3 interacts with Dda3 and Kif2A in a molecular complex that is increased in mitosis and requires phosphorylation by AurKA. We provide evidence that ATIP3 maintains constant mitotic spindle size by decreasing Kif2A and Dda3 recruitment at the poles in an AurKA-dependent manner. Results indicate reciprocal regulation of ATIP3 and AurKA. Collectively, these data support a novel mechanism controlling mitotic spindle length and emphasize the pivotal role of AurKA in regulating ATIP3-Dda3-Kif2A complex in mitosis.



## INTRODUCTION

Maintaining the integrity of the mitotic spindle is essential to ensure proper chromosome segregation and normal cell division. Any defect in spindle length can lead to chromosomal instability and aneuploidy, which are hallmarks of cancer. Spindle size in metaphase varies among different cell types and species but remains constant for a given cell (Goshima and Scholey, 2010), despite its high dynamics (Goshima et al., 2005). This is essential for proper positioning of replicated chromosomes at the centers of the two daughter cells after cell division. Maintaining a constant spindle length is ensured by different mechanisms including microtubule (MT) poleward flux, which consists of MT translocation towards the poles, coupled to a balance between polymerization of MT plus ends at kinetochores and depolymerization of MT minus ends at the poles (Mitchison and Salmon, 1992). Mitotic spindle length is thus controlled by different MT-associated proteins (MAPs) that regulate MT dynamics (Goshima et al., 2005; Tillement et al., 2009; Prosser and Pelletier, 2017), among which the Kif2A kinesin plays a major role (Ganem and Compton, 2004).

Kif2A is a MT-depolymerizing kinesin of the kinesin-13 family that also includes Kif2b and MCAK/Kif2c (Desai et al., 1999; Manning et al., 2007). During mitosis, Kif2A is localized at the spindle poles where it depolymerizes MT minus ends (Desai et al., 1999). Targeting of Kif2A at the pole is mediated by the minus-end-directed motor protein Dynein (Gaetz and Kapoor, 2004). Kif2A recruitment at the poles is also increased by interaction with MT-associated Dda3 protein (also known as PSRC1), whose expression and phosphorylation are markedly increased in mitosis (Jang et al., 2008). Importantly, depletion of either Kif2A or Dda3 increases mitotic spindle size (Ganem and Compton, 2004; Jang and Fang, 2009). Mitotic kinase Aurora A (AurKA) has been shown to phosphorylate both Dda3 (Jang et al., 2011) and Kif2A (Jang et al., 2009) and decrease Kif2A depolymerizing activity and recruitment at the poles (Jang et al., 2009). Of note, AurKA inhibition decreases spindle length (Bird and Hyman, 2008). However, whether phosphorylation by AurKA regulates the Kif2A/Dda3 complex and contributes to its effects on spindle length remains to be investigated.

ATIP3 is the major product of candidate tumor suppressor *MTUS1* gene whose expression is markedly down-regulated in aggressive breast tumors (Rodrigues-Ferreira et al., 2009; Molina et al., 2013). ATIP3 is a MAP that decorates the centrosome and MT lattice in interphase and the mitotic spindle and spindle poles

during mitosis (Rodrigues-Ferreira et al., 2009). Previous studies have shown that ATIP3 is a potent MT stabilizer and that its depletion increases MT dynamic instability at the plus ends (Molina et al., 2013). In interphase, ATIP3 directly interacts with End-Binding protein EB1, a master regulator of MT dynamics, and behaves as an endogenous antagonist of EB1 to reduce its exchange rate at MT plus ends (Velot et al., 2015; Nehlig et al., 2017), with subsequent reduction in cell polarity, migration and cancer metastasis (Molina et al., 2013). Consistent with its tumor suppressor effects, ATIP3 has been shown to reduce tumor growth whereas its depletion increases cell proliferation (Rodrigues-Ferreira et al., 2009). However, the mechanisms by which ATIP3 regulates cell division remain unknown.

In the present study, we show that ATIP3 silencing leads to reduced mitotic spindle length. Of interest, ATIP3 forms a complex with Kif2A and Dda3 and decreases their recruitment at the poles to maintain spindle size. AurKA activity stabilizes the ATIP3-Dda3-Kif2A complex and contributes to the effects of ATIP3 on spindle size. Our results support a novel mechanism regulating mitotic spindle integrity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cell lines and synchronization***

Human cancer cell lines HCC1143, MCF-7, MCF-7 cells stably expressing endogenous levels of GFP-ATIP3 (HC6 clone), and HeLa cells were described previously (Rodrigues-Ferreira et al., 2009; Molina et al., 2013). MCF-7 cells express undetectable levels of ATIP3, whereas HCC1143 and HeLa cells express endogenous ATIP3 (Rodrigues-Ferreira et al., 2009; Molina et al., 2013). HeLa cells were cultured in DMEM supplemented with 10% bovine calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin (all from Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. MCF-7 cells were cultured in DMEM-F12 supplemented with 5% bovine calf serum, and HCC1143 cells were cultured in RPMI supplemented with 10% bovine calf serum and 1% sodium pyruvate. Cells were routinely authenticated by morphologic observation and tested for absence of mycoplasma contamination using Venor<sup>®</sup> GeM Advance Kit (MB Minerva biolabs<sup>®</sup>).

For synchronization in metaphase, HCC1143 and MCF-7 cells were treated with 50 ng/ml nocodazole for 16h, released for 45 minutes, and incubated with 5µM MG132 (474790; Calbiochem) for 1h30.

### ***Plasmid constructs, siRNAs and transfections***

Plasmids encoding GFP-ATIP3, GFP-D1, GFP-D2, GFP-D2, GFP-D2N, GFP-D2C, GFP-D3, GFP-ATIP3delCN and GFP-D2delCN were described elsewhere (Molina et al., 2013; Velot et al., 2015). Deletion mutants GFP-ATIP3delCN2 and GFP-D2delCN2 (amino-acids deleted at positions 635 to 410) were obtained by PCR-amplification of the ATIP3 and D2 sequence, respectively, using the following oligonucleotides: 5'- GGG TCC GTT TCT GCG TTG TTT TCT GGT AAT GCC GCT GTC -3' and 5'- GAC AGC GGC ATT ACC AGA AAA CAA CGC AGA AAC GGA CCC -3' and QuikChange<sup>®</sup> II XL Site-Directed and Mutagenesis Kit (Agilent). Plasmids encoding GFP-AurA and GFP-AurA-KD were gifts of Claude Prigent (Institut de Génétique et Développement de Rennes, France). Plasmid encoding Kif2A-GFP was provided by Jamel Chelly (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France) and plasmid encoding

Dda3-Flag was from Genscript. All cDNA constructs were transfected (2 to 4 $\mu$ g) for 24h using X-treme Gene 9 (Roche) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen). All specific siRNAs and scrambled siRNA were from Dharmacon (ThermoFisher Scientific). The following sequences were used: ATIP3#1, 5'-UGGCAGAGGUUUAAGGUUA-3'; ATIP3#2, 5'-GCAAUAGCUGCUCCAAAA-3'; Kif2A, 5'-GGCAAAGAGAUUGACCUGG-3'; Aurora A, 5'-AUGCCCUGUCUACUGUCA-3'; Dda3, 5'-AAGCAAGACUUCAGUAGCAUU-3'. All siRNAs (50 nM) were transfected for 48h to 72h using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and silencing efficiency was evaluated by immunoblotting. Antibodies used for immunoblotting were rabbit anti-ATIP3 (anti-MTUS1; ARP44419-P050; Aviva Systems, 1/1000e), rabbit anti-Kif2A (ab37005; Abcam, 1/5000e), rabbit anti-Kif2B (ab194789; Abcam, 1/1000e), mouse anti-Aurora A (ab13824; Abcam, 1/1000e), rabbit anti-Dda3 (GTX128047; GeneTex, 1/1000e), rabbit anti-GFP (6556; Abcam, 1/1000e), mouse anti-GFP (ab1218; Abcam, 1/1000e), mouse anti-alpha-tubulin (T9026; Abcam, 1/5000e), rabbit anti-phospho-histone H3 (06-570; Millipore, 1/1000e), mouse anti-gamma-actin (ab123034; Abcam, 1/5000e), mouse anti-vinculin (V9264; Sigma, 1/5000e).

### ***Immunoprecipitations***

HeLa or MCF-7 cells were transfected as described above and lysed in lysis buffer containing 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2M PMSF, 1mM Aprotinin, 5mg/ml Leupeptin, 2mg/ml Pepstatin, 0.2M orthovanadate, 1M sodium fluoride, and 10 $\mu$ M okadaic acid. Lysates were centrifuged, incubated with uncoupled magnetic agarose beads at 4°C for 15 minutes, and then incubated with anti-GFP VHH coupled to magnetic agarose beads (GFP-trap\_MA; Chromotek) at 4°C overnight. Antibody beads were recovered with a bar magnet, washed once with the lysis buffer in the presence of anti-proteases and then twice with the lysis buffer, and analyzed by Western blotting with appropriate antibodies as described above.

Results shown are representative of 3 to 5 independent experiments.

## ***Proteomics and Mass spectrometry***

MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP for 24h then lysed as described above. For immuno-isolated samples, 1 mg extract was incubated with 25  $\mu$ L magnetic beads (GFP-trap\_MA; Chromotek) for 2 hours at 4°C.

Proteins on magnetic beads were washed twice with 100  $\mu$ L of 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and we performed on-beads digestion with 0.2  $\mu$ g of trypsin/LysC (Promega) for 1 hour in 100  $\mu$ L of 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Samples were then loaded onto a homemade C18 StageTips for desalting (principle by stacking one 3M Empore SPE Extraction Disk Octadecyl (C18) and beads from SepPak C18 Cartridge Waters into a 200  $\mu$ L micropipette tip). Peptides were eluted using 40/60 MeCN/H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid and vacuum concentrated to dryness.

Online chromatography was performed with an RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo Scientific) coupled online to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific). Peptides were trapped on a C18 column (75  $\mu$ m inner diameter  $\times$  2 cm; nanoViper Acclaim PepMap<sup>TM</sup> 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 MeCN/H<sub>2</sub>O in 0.1% formic acid) at a flow rate of 4.0  $\mu$ L/min over 4 min. Separation was performed on a 50 cm  $\times$  75  $\mu$ m C18 column (nanoViper Acclaim PepMap<sup>TM</sup> RSLC, 2  $\mu$ m, 100Å, Thermo Scientific) regulated to a temperature of 55°C with a linear gradient of 2% to 30% buffer B (100% MeCN in 0.1% formic acid) at a flow rate of 350 nL/min over 160 min. Full-scan MS was acquired in the Orbitrap analyzer with a resolution set to 120,000 and ions from each full scan were HCD fragmented and analyzed in the linear ion trap.

For identification the data were searched against the SwissProt Homo Sapiens (February 2017, no isoforms) database using Sequest HF through proteome discoverer (version 2.1). Enzyme specificity was set to trypsin and a maximum of two missed cleavage sites were allowed. Oxidized methionine, N-terminal acetylation, and carbamidomethyl cysteine were set as variable modifications. Maximum allowed mass deviation was set to 10 ppm for monoisotopic precursor ions and 0.6 Da for MS/MS peaks.

The resulting files were further processed using myProMS (Pouillet et al., 2007) v3.6 (work in progress). FDR calculation used Percolator and was set to 1% at the peptide level for the whole study. The label free quantification was performed by peptide Extracted Ion Chromatograms (XICs) computed with MassChroQ

version 2.2.2 (Valot et al., 2011). For protein quantification, XICs from proteotypic peptides shared between compared conditions (TopN matching) with no missed cleavages were used. Median and scale normalization was applied on the total signal to correct the XICs for each biological replicate. To estimate the significance of the change in protein abundance, a linear model (adjusted on peptides and biological replicates) was performed and p-values were adjusted with a Benjamini–Hochberg FDR procedure with a control threshold set to 0.05. Fold change-based GO enrichment analysis was performed as in Kowal et al. (Kowal et al., 2016).

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaíno et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD009182 (username: reviewer03478@ebi.ac.uk, password: UFFpYuYZ)

### ***Immunofluorescence***

HeLa, HCC1143 or MCF-7 cells were fixed on cover glasses with ice-cold methanol for 5 minutes and washed with PBS. Coverslips were subsequently incubated at room temperature for 1 hour in primary antibodies and for 1 hour in Alexa Fluor 488-, Alexa Fluor 549- and Alexa Fluor 647-coupled secondary antibodies diluted in PBS/Triton 0.1%, BSA 0.2%. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Kif2A (ab37005; Abcam, 1/250e), rabbit anti-pericentrin (ab4448; Abcam, 1/500e), rabbit anti-Dda3 (GTX128047; GeneTex, 1/500e), mouse anti-Aurora A (ab13824; Abcam, 1/200e), rabbit Phospho-Aurora A (Thr288) (3079S; Cell Signaling, 1/200e), mouse anti-GFP (ab1218; Abcam, 1/250e), rat anti-alpha-tubulin (ab6160; Abcam, 1/500e), and mouse anti-alpha-tubulin (T9026; Sigma, 1/100e). Coverslips were fixed with Glycergel Mounting Medium (Dako) coupled with DAPI.

Images were acquired with a confocal laser scanning microscope Dmi8- SP8 with an HC PL APO CS2 40x-1.3 Oil (Leica). Linescan analyses of pole-to-pole distance and fluorescence intensities were done with Image J. At least 30 cells in 4 to 10 fields per condition were analyzed.

Results shown are representative of 3 to 5 independent experiments.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were done using GraphPad Prism software. Data in bar graphs (mean +/- SD) and dot plots were analyzed using two-tail unpaired t-test and ANOVA test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### **ATIP3 silencing induces reduced mitotic spindle length**

To evaluate the consequences of ATIP3 depletion in mitosis, HeLa cells were transfected with two independent siRNAs targeting ATIP3 (siA#1 and siA#2) (Figure 1A) and analyzed by immunofluorescence using anti-pericentrin antibodies. By measuring pole-to-pole distance, we observed that ATIP3 silencing with each siRNAs leads to reduced spindle size (Figure 1B). We confirmed the same results in HCC1143 breast cancer cells using both siRNAs (Supplementary Figure S1A). Conversely, expression of GFP-ATIP3 in MCF-7 cells leads to a significant increase in spindle size compared to control cells expressing GFP (Supplementary Figure S1B).

Of note, others mitotic defects were observed in ATIP3-depleted cells, including multipolar spindles (Supplementary Figure S1C) and spindle mispositioning (Supplementary Figure S1D). ATIP3-silencing also reduced mitotic index (Supplementary Figure S1C) but had no effect on spindle orientation, symmetry and cell size (Supplementary Figure S1E).

### **ATIP3 interacts with Kif2A**

A proteomic approach was undertaken to identify potential binding partners of ATIP3 in breast cancer cells. Anti-GFP antibodies were used to immunoprecipitate molecular complexes from MCF-7 cells expressing either GFP or GFP-ATIP3 fusion protein. Mass spectrometry analysis allowed us to identify 145 proteins that selectively interact with ATIP3 (Figure 2A and supplementary Table S1), eleven of which were related to the microtubule cytoskeleton and/or mitosis (Table 1). Among those the Kif2A kinesin, a major regulator of mitotic spindle size, was selected for further studies. Proteomic analyses were validated by co-immunoprecipitation studies revealing molecular complexes between GFP-ATIP3 and endogenous Kif2A (Figure 2B). In contrast, kinesin Kif2B - that belongs to the same kinesin-13 family as Kif2A - was not retained on GFP-ATIP3 immunoprecipitates (Figure 2B), indicating specificity of ATIP3-Kif2A interaction. In a reciprocal experiment, endogenous ATIP3 was shown to interact with Kif2A-GFP, further confirming the presence of ATIP3-Kif2A molecular complexes in living cells (Figure 2C). As shown in Figure 2D, ATIP3 not only interacts, but also co-localizes with Kif2A at the mitotic spindle poles in metaphase.



To get insight into ATIP3-Kif2A interaction, full-length ATIP3 was cleaved into three regions designated D1, D2 and D3 (Figure 2E) that were fused to GFP. Co-immunoprecipitation experiments revealed that the central D2 region, but not D1 or D3, is involved in Kif2A interaction (Figure 2E) and that the C-terminal part of the D2 region (D2C) is sufficient to bind Kif2A (Figure 2F). To map further the Kif2A-interacting region of ATIP3, deletion mutants were analyzed by co-immunoprecipitation. Deletion of short sequences in the D2C region of both ATIP3 (delCN and delCN2 mutants) and D2 polypeptide (D2delCN and D2delCN2 mutants) led to a marked decrease in Kif2A interaction (Figure 2F and Supplementary Figure 2). Thus, a minimal region of 112 amino-acids (CN sequence) is required for ATIP3 interaction with Kif2A.

To map the domain of Kif2A that interacts with ATIP3, we used Myc-tagged deletion mutants comprising either the N-terminal (myc-Nter) or the C-terminal (myc-Cter) portion of the molecule. As shown in Figure 2G, GFP-ATIP3 immunocomplexes retained the N-terminal region of Kif2A (myc-Nter), a sequence which is highly divergent among members of the kinesin-13 family (Welburn and Cheeseman, 2012), whereas the C-terminal part (myc-Cter) of Kif2A did not interact with ATIP3. Altogether, these results indicate that ATIP3 interacts with the N-terminal part of Kif2A via the CN region.

### **ATIP3 maintains mitotic spindle length by decreasing Kif2A recruitment at the poles**

We then investigated whether ATIP3-Kif2A molecular complexes may be functionally involved in the control of mitotic spindle length in metaphase. Immunofluorescence studies performed in HeLa cells revealed that Kif2A fluorescence intensity at the spindle poles was markedly increased upon ATIP3 silencing (Figure 3A) with no significant difference in Kif2A intensity in the cytoplasm (Supplementary Figure S3A). Intensity levels of pericentrin, a major spindle pole protein, were unaffected by ATIP3 silencing (Supplementary Figure S3B), indicating that ATIP3 effect on Kif2A is specific. Of note, ATIP3 depletion had no effect on Kif2A expression levels (Figure 3A), suggesting that increased Kif2A intensity may reflect increased recruitment of the protein at the spindle poles.

To evaluate whether increased Kif2A at the poles may contribute to the effects of ATIP3-depletion on spindle size, we investigated the functional consequences of silencing both Kif2A and ATIP3. As shown in Figure 3B, Kif2A-silencing rescued the

phenotype of ATIP3-depletion on spindle length, indicating that increased Kif2A recruitment at the spindle poles is responsible for ATIP3 silencing-mediated shortening of the mitotic spindle. Of note, in contrast to previous reports (Ganem and Compton, 2004), Kif2A-silencing alone in the presence of ATIP3 did not lead to increased mitotic spindle length in our cellular model.

Phenotypic rescue of ATIP3-silencing was also studied using GFP-ATIP3 construct and deletion mutants. As expected, ectopic expression of GFP-ATIP3 in ATIP3-depleted cells decreased Kif2A recruitment at the poles (Supplementary Fig.S3C) and restored spindle size similar to control levels (Figure 3C). In contrast, deletion mutants GFP-ATIP3delCN and GFP-ATIP3delCN2 - that are unable to interact with Kif2A - failed to rescue the phenotype in ATIP3-deficient cells (Figure 3C) although expression levels were similar to wild type constructs (Supplemental Figure S3D). As shown in Supplementary Fig.S3E, the Kif2A-interacting region GFP-D2, but not deletion mutants GFP-D2delCN and GFP-D2delCN2, also restored spindle length in ATIP3-depleted cells. Together these studies support the conclusion that ATIP3-Kif2A interaction participates in the control of mitotic spindle size by ATIP3.

### **ATIP3 forms a complex with Kif2A and Dda3**

It has been previously reported that the MT-associated Dda3 protein increases the efficiency of Kif2A targeting to spindle poles (Jang et al., 2008), leading us to investigate whether ATIP3 effects on Kif2A may involve Dda3. As shown in Figure 4A, Dda3 silencing indeed rescued the effects of ATIP3 silencing on Kif2A intensity at the poles. Thus, Dda3 contributes to increased Kif2A recruitment at the poles upon ATIP3 silencing. Double silencing of Dda3 and ATIP3 also restored the size of the mitotic spindle (Figure 4A), further indicating that Kif2A recruitment at the poles by Dda3 is functionally related to reduced mitotic spindle length upon ATIP3-silencing.

Immunoprecipitation studies revealed the presence of Dda3 protein in GFP-ATIP3 immunocomplexes (Figure 4B), indicating that ATIP3 is able to bind Dda3 in living cells (Figure 4B). To evaluate whether Dda3 and Kif2A may interfere with or contribute to ATIP3-Kif2A and ATIP3-Dda3 molecular complexes, MCF-7 cells were silenced using Dda3 and Kif2A siRNA prior to immunoprecipitation with GFP-ATIP3. As shown in Figure 4C, Dda3 depletion decreased the levels of Kif2A in ATIP3 immunoprecipitates, indicating that Dda3 is required for ATIP3-Kif2A interaction. In the same manner, Kif2A

silencing impaired ATIP3-Dda3 interaction, therefore suggesting the existence of a molecular complex comprising ATIP3, Dda3 and Kif2A.

To gain insight into the functional connection between ATIP3 and Dda3, we analyzed reciprocal regulation of Dda3 and ATIP3 localization in mitotic cells. As previously shown for Kif2A, Dda3 fluorescence intensity at the spindle poles was significantly increased in ATIP3-silenced cells (Figure 4D left). Interestingly, increased Dda3 recruitment at the poles was accompanied by increased expression levels in western blot upon ATIP3 silencing (Figure 4D right). Conversely, expression of GFP-ATIP3 in MCF-7 cells led to a decrease of both Dda3 intensity at the spindle poles and protein expression levels in western blot (Figure 4E). Together, these studies suggest that ATIP3 silencing may increase steady-state levels of Dda3, with subsequent increase in Dda3 intensity at the poles. This in turn may account for increased recruitment of Kif2A by Dda3 at the spindle poles upon ATIP3-silencing. Of importance, silencing of either Kif2A or Dda3 had no significant effect on ATIP3 intensity at the poles (Figure 4F). Thus, localization of ATIP3 at the spindle poles is independent of Kif2A and Dda3 interaction but regulates the targeting of Kif2A/Dda3 complexes.

### **ATIP3-Kif2A-Dda3 complex is regulated in mitosis**

Dda3 levels have been shown to be elevated in mitosis (Jang et al., 2008) leading us to investigate whether ATIP3-Dda3 interaction may also be regulated in mitosis. Co-immunoprecipitation studies performed in synchronized MCF-7 cells expressing GFP-ATIP3 indeed indicated that ATIP3-Dda3 interaction is increased in mitosis (Figure 5A). Consistently, ATIP3-Kif2A complexes were also increased in synchronized cells compared to interphase cells (Figure 5A), although Kif2A levels remained unchanged. Data showing Dda3 hyperphosphorylation in mitosis (Jang et al., 2010) prompted us to determine whether ATIP3 interaction with its partners Kif2A and Dda3 may be regulated by phosphorylation. As expected, treatment of the cells with lambda phosphatase prior to immunoprecipitation with GFP-ATIP3 showed a total loss of ATIP3-Dda3 and ATIP3-Kif2A interactions (Figure 5B), suggesting that these interactions may require protein phosphorylation.

### **Aurora Kinase A plays a pivotal role in the ATIP3 phenotype**

Mitosis is tightly regulated by mitotic kinases among which Aurora kinase A (AurKA), whose expression is markedly increased in G2/M, localizes at the poles of the spindle. AurKA has been shown to phosphorylate Dda3 (Jang et al., 2010) and to decrease Kif2A activity and recruitment to the spindle poles by phosphorylation (Jang et al., 2011). We thus investigated whether AurKA may regulate the ATIP3-Kif2A-Dda3 complex and participate in the phenotype associated with ATIP3 deficiency in mitosis. To evaluate the impact of AurKA activity on ATIP3 molecular complexes, cells were transfected with AurKA siRNA or treated with Aurora kinase inhibitor MLN8054. As shown in Figure 6A, AurKA depletion markedly decreased ATIP3-Kif2A interaction, and treatment with MLN8054 impaired both ATIP3-Kif2A and ATIP3-Dda3 interactions (Figure 6B), therefore demonstrating that phosphorylation by AurKA is required for stabilization of the ATIP3-Kif2A-Dda3 complex. Co-immunoprecipitation experiments revealed weak association between AurKA and GFP-ATIP3 (Supplementary S4A) and have been quite difficult to reproduce even in synchronized cells, suggesting that ATIP3-AurKA complexes may be weak and/or transient.

AurKA silencing or inhibition by MLN8054 not only disrupts ATIP3-Kif2A-Dda3 molecular complexes, but also mimics ATIP3-silencing effects on increased Kif2A recruitment at the pole and reduced spindle size (Figure 6C and Supplementary Figure S4B). Double silencing with siATIP3 and siAurKA had no additional effect on Kif2A recruitment and spindle size compared to siAurKA alone (Figure 6C). Interestingly, both AurKA silencing and inhibition by MLN8054 led to a significant decrease in GFP-ATIP3 intensity at the spindle poles in metaphase (Figure 6D), indicating that ATIP3 recruitment at the poles requires AurKA activity.

Reciprocal experiments aiming at investigating the consequence of ATIP3 depletion on AurKA localization in mitosis revealed that ATIP3 silencing decreases the intensity of AurKA at the spindle poles, as well as the intensity of phosphorylated (Thr288) active form of the kinase (Figure 6E). Thus, ATIP3 may be involved in maintaining an active pool of AurKA at the spindle poles. We further addressed the question of whether decreased AurKA levels at the poles may contribute to the phenotype of ATIP3-silencing on spindle length. To this end, we studied the consequence of ectopic expression of a GFP-AurKA construct, or a kinase-dead mutant (GFP-AurA-KD) on spindle size in ATIP3-deficient and proficient cells. As shown in Figure 6F, expression of both GFP-AurKA and GFP-AurKA-KD had little effect on control, ATIP3-positive,

cells. In contrast, in ATIP3-deficient cells, GFP-AurKA rescued the size of the mitotic spindle whereas the kinase-dead (AurKA-KD) mutant remained ineffective (Figure 6F). These results therefore demonstrate that AurKA activity is required to restore mitotic spindle defects induced by ATIP3 deficiency, illustrating the reciprocal regulation of ATIP3 and active AurKA in the control of mitotic spindle length and the pivotal role of AurKA in the ATIP3 phenotype.

## DISCUSSION

Studies presented here indicate that microtubule-associated protein ATIP3 interacts with Kif2A and Dda3 in a molecular complex that requires AurKA activity. The ATIP3-Dda3-Kif2A complex is increased in synchronized cells, which is consistent with the observation that Dda3 and AurKA protein levels are up-regulated in mitosis (Jang et al., 2008; Kimura et al., 1997). Interestingly, ATIP3 contributes to maintaining active AurKA at the poles, and AurKA reciprocally maintains ATIP3 recruitment at this location. This positive regulatory loop may account for stabilization of the interaction between ATIP3, Kif2A and Dda3. By interacting with Kif2A and Dda3, ATIP3 restrains their targeting at the spindle poles in metaphase, thereby reducing MT minus ends depolymerization by Kif2A, which in turn may contribute to maintaining proper mitotic spindle size. While ATIP3 regulates Kif2A/Dda3 recruitment, Kif2A and Dda3 have no effect on ATIP3 localization, suggesting that ATIP3 orchestrates the targeting of both Kif2A and Dda3 at the poles to control spindle length (Figure 7).

In ATIP3-silenced cells, AurKA levels at the poles are decreased, which may lead to reduced phosphorylation of Kif2A and increased Kif2A recruitment at the poles (Jang 2011), with subsequent increase in MT-depolymerization at the poles. Re-expression of active AurKA, but not its dead mutant, rescues the phenotype of ATIP3 silencing on spindle size. ATIP3 silencing concomitantly increases Dda3 levels, thereby favoring the formation of Kif2A/Dda3 complexes which in the absence of ATIP3 may be free to accumulate at the spindle poles. These results support a model in which ATIP3 silencing reduces spindle length in metaphase by two converging mechanisms including decreased AurKA targeting at the poles and up-regulation of Dda3 (Figure 7). Both pathways may lead to increased Kif2A depolymerizing activity at the poles, resulting in shorter mitotic spindle size.

Negative regulation of Kif2A accumulation at spindle poles is essential to prevent imbalanced MT dynamics that may result in reduced spindle size and mitotic abnormalities (Goshima and Scholey, 2010). Besides ATIP3, other negative regulators of the Dda3/Kif2A complex have been recently reported. Indeed, Mdp3 (microtubule-associated protein 7 domain-containing 3 also known as MAP7D3) has been shown to form a complex with Dda3 and Kif2A in mitosis and counteracts Kif2A recruitment mediated by Dda3 at the pole (Kwon et al., 2016). Another Dda3 partner, the E3 ubiquitin ligase ASB7 (Cullin 5-interacting suppressor of cytokine signaling box 7) was

shown to degrade Dda3 through the ubiquitin-proteasome degradation pathway, thereby reducing Kif2A recruitment at the pole (Uematsu et al., 2016). Our data showing that ATIP3 silencing increases Dda3 expression levels suggest that ATIP3 might also contribute to Dda3 degradation by the proteasome, although it cannot be excluded that ATIP3 may decrease Dda3 expression at the mRNA level by acting on transcription factors or miRNAs. Another mechanism by which ATIP3 controls the recruitment of Kif2A and Dda3 may involve regulation of their dynamic exchange between cytosolic pools and MT minus ends at the spindle pole. In this regard, ATIP3 silencing may accelerate Dda3 and Kif2A turnover at the pole, which would result in increased Kif2A activity and decreased spindle length. Of interest, a similar mechanism, by which ATIP3 interacts with end-binding protein EB1 in the cytosol to slower its dynamic exchange on its binding site at growing microtubule ends, has been recently described (Velot et al., 2015).

The mitotic kinase AurKA plays a pivotal role in the control of mitotic spindle length. AurKA has been shown to phosphorylate Kif2A and decreases its activity and targeting at the poles (Jang et al., 2009). TPX2, a major substrate and regulator of AurKA, also interacts with Kif2A and its phosphorylation by AurKA contributes to maintaining a correct spindle size through regulating MT flux (Fu et al., 2015). Of note, ATIP3 depletion mimics the phenotype induced by AurKA silencing on mitotic spindle length and Kif2A recruitment at the pole. Furthermore, ATIP3 regulates AurKA targeting at the pole, and requires AurKA activity for its localization and function, indicating reciprocal regulation between these proteins. Examination of ATIP3 sequences revealed the presence of several AurKA consensus phosphorylation sites, raising the possibility that ATIP3 may be both a regulator and a substrate of AurKA.

These findings may have clinical relevance in the field of cancer. Indeed, spindle size abnormalities cause cellular defects in cell division that ultimately lead to aneuploidy and cancer (Goshima and Scholey, 2010), and this may further explain the aggressiveness of ATIP3-deficient breast tumors. Based on our results showing that ATIP3 deficient cells present short metaphase spindle and increased Kif2A/Dda3 recruitment at the poles, inhibiting Kif2A activity or targeting Dda3 degradation may represent interesting therapeutic options for ATIP3-deficient tumors. Of interest, a selective inhibitor of Kif2A activity, DHTP, has been identified recently (Talje et al., 2014). Further studies are warranted to validate the efficiency of this compound for personalized treatments of ATIP3-negative breast cancer.

Results presented here provide the first evidence for the role of AurKA in the formation of the Kif2A-Dda3 complex and highlight the pivotal role of ATIP3 and AurKA on spindle length regulation by Kif2A/Dda3. This study extends our knowledge of the control of the mitotic spindle size.

## **Acknowledgements**

We thank Dr Jamel CHELLY (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire) for the kind gift of Kif2A-GFP construct and Fred LEEUW and Corinne LAPLACE from Gustave Roussy Cancer Campus, Plate-forme Imagerie et Cytométrie (UMS 23/3655) for technical help. We wish to thank Dr Vasily OGRYZKO and Aline VOUILLON (Proteomics Platform of the Gustave Roussy Cancer Campus) for technical assistance and helpful discussion.

## **Fundings**

This work was supported by the Inserm, the CNRS, the Ligue Contre le Cancer, the Institut Gustave Roussy, the Labex LERMIT, Odyssea and Prolific (grants to C.N), by the “Région Ile-de-France” and Fondation pour la Recherche Médicale (grants to D.L.) and by grants from TA2015 and TA2018 (Université Paris-Saclay, France) (grants to A.N).

## **Conflict of interests**

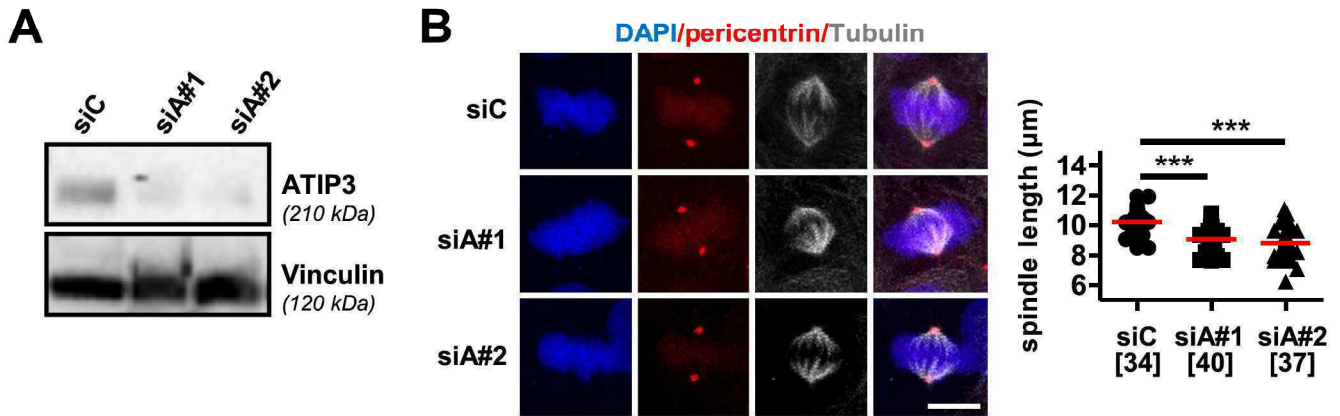
The authors declare that they have no conflict of interest.



## References

- Bird, A.W., Hyman, A.A., 2008. Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J. Cell Biol.* 182, 289–300. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802005>
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., Walczak, C.E., 1999. Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. *Cell* 96, 69–78. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80960-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80960-5)
- Fu, J., Bian, M., Xin, G., Deng, Z., Luo, J., Guo, X., Chen, H., Wang, Y., Jiang, Q., Zhang, C., 2015. TPX2 phosphorylation maintains metaphase spindle length by regulating microtubule flux. *J. Cell Biol.* 210, 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412109>
- Gaetz, J., Kapoor, T.M., 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* 166, 465–471. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404015>
- Ganem, N.J., Compton, D.A., 2004. The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J. Cell Biol.* 166, 473–478. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404012>
- Goshima, G., Scholey, J.M., 2010. Control of Mitotic Spindle Length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 21–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104006>
- Goshima, G., Wollman, R., Stuurman, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., 2005. Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* CB 15, 1979–1988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.054>
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., Fang, G., 2009. Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J. Cell Sci.* 122, 1334–1341. <https://doi.org/10.1242/jcs.044321>
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Yates, J.R., Fang, G., 2011. Mitotic kinases regulate MT-polymerizing/MT-bundling activity of DDA3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.004>
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Yates, J.R., Fang, G., 2010. Phospho-regulation of DDA3 function in mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.115>
- Jang, C.-Y., Fang, G., 2009. The N-terminal domain of DDA3 regulates the spindle-association of the microtubule depolymerase Kif2a and controls the mitotic function of DDA3. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3165–3171. <https://doi.org/10.4161/cc.8.19.9724>
- Jang, C.-Y., Wong, J., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., Fang, G., 2008. DDA3 recruits microtubule depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement. *J. Cell Biol.* 181, 255–267. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711032>
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K., Okano, Y., 1997. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.* 272, 13766–13771.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., Théry, C., 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E968–977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Kwon, H.J., Park, J.E., Song, H., Jang, C.-Y., 2016. DDA3 and Mdp3 modulate Kif2a recruitment onto the mitotic spindle to control minus-end spindle dynamics. *J. Cell Sci.* 129, 2719–2725. <https://doi.org/10.1242/jcs.180109>
- Manning, A.L., Ganem, N.J., Bakhoun, S.F., Wagenbach, M., Wordeman, L., Compton, D.A., 2007. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 2970–2979. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0110>

- Mitchison, T.J., Salmon, E.D., 1992. Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. *J. Cell Biol.* 119, 569–582.
- Molina, A., Velot, L., Ghouinem, L., Abdelkarim, M., Bouchet, B.P., Luissint, A.-C., Bouhlef, I., Morel, M., Sapharikas, E., Di Tommaso, A., Honoré, S., Braguer, D., Gruel, N., Vincent-Salomon, A., Delattre, O., Sigal-Zafrani, B., André, F., Terris, B., Akhmanova, A., Di Benedetto, M., Nahmias, C., Rodrigues-Ferreira, S., 2013. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res.* 73, 2905–2915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3565>
- Nehlig, A., Molina, A., Rodrigues-Ferreira, S., Honoré, S., Nahmias, C., 2017. Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2381–2393. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2476-2>
- Pouillet, P., Carpentier, S., Barillot, E., 2007. myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* 7, 2553–2556. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600784>
- Prosser, S.L., Pelletier, L., 2017. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 187–201. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162>
- Rodrigues-Ferreira, S., Di Tommaso, A., Dimitrov, A., Cazaubon, S., Gruel, N., Colasson, H., Nicolas, A., Chaverot, N., Molinié, V., Reyat, F., Sigal-Zafrani, B., Terris, B., Delattre, O., Radvanyi, F., Perez, F., Vincent-Salomon, A., Nahmias, C., 2009. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PloS One* 4, e7239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007239>
- Talje, L., Ben El Kadhi, K., Atchia, K., Tremblay-Boudreault, T., Carreno, S., Kwok, B.H., 2014. DHTP is an allosteric inhibitor of the kinesin-13 family of microtubule depolymerases. *FEBS Lett.* 588, 2315–2320. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.024>
- Tillement, V., Remy, M.-H., Raynaud-Messina, B., Mazzolini, L., Haren, L., Merdes, A., 2009. Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus. *Biol. Cell* 101, 1–11. <https://doi.org/10.1042/BC20070162>
- Uematsu, K., Okumura, F., Tonogai, S., Joo-Okumura, A., Alemayehu, D.H., Nishikimi, A., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., Kamura, T., 2016. ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. *J. Cell Biol.* 215, 95–106. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603062>
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., Zivy, M., 2011. MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics* 11, 3572–3577. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100120>
- Velot, L., Molina, A., Rodrigues-Ferreira, S., Nehlig, A., Bouchet, B.P., Morel, M., Leconte, L., Serre, L., Arnal, I., Braguer, D., Savina, A., Honore, S., Nahmias, C., 2015. Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3. *Oncotarget* 6, 43557–43570. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6196>
- Vizcaíno, J.A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianes, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q.-W., Wang, R., Hermjakob, H., 2016. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D447–456. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1145>
- Welburn, J.P.I., Cheeseman, I.M., 2012. The microtubule-binding protein Cep170 promotes the targeting of the kinesin-13 depolymerase Kif2b to the mitotic spindle. *Mol. Biol. Cell* 23, 4786–4795. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-03-0214>

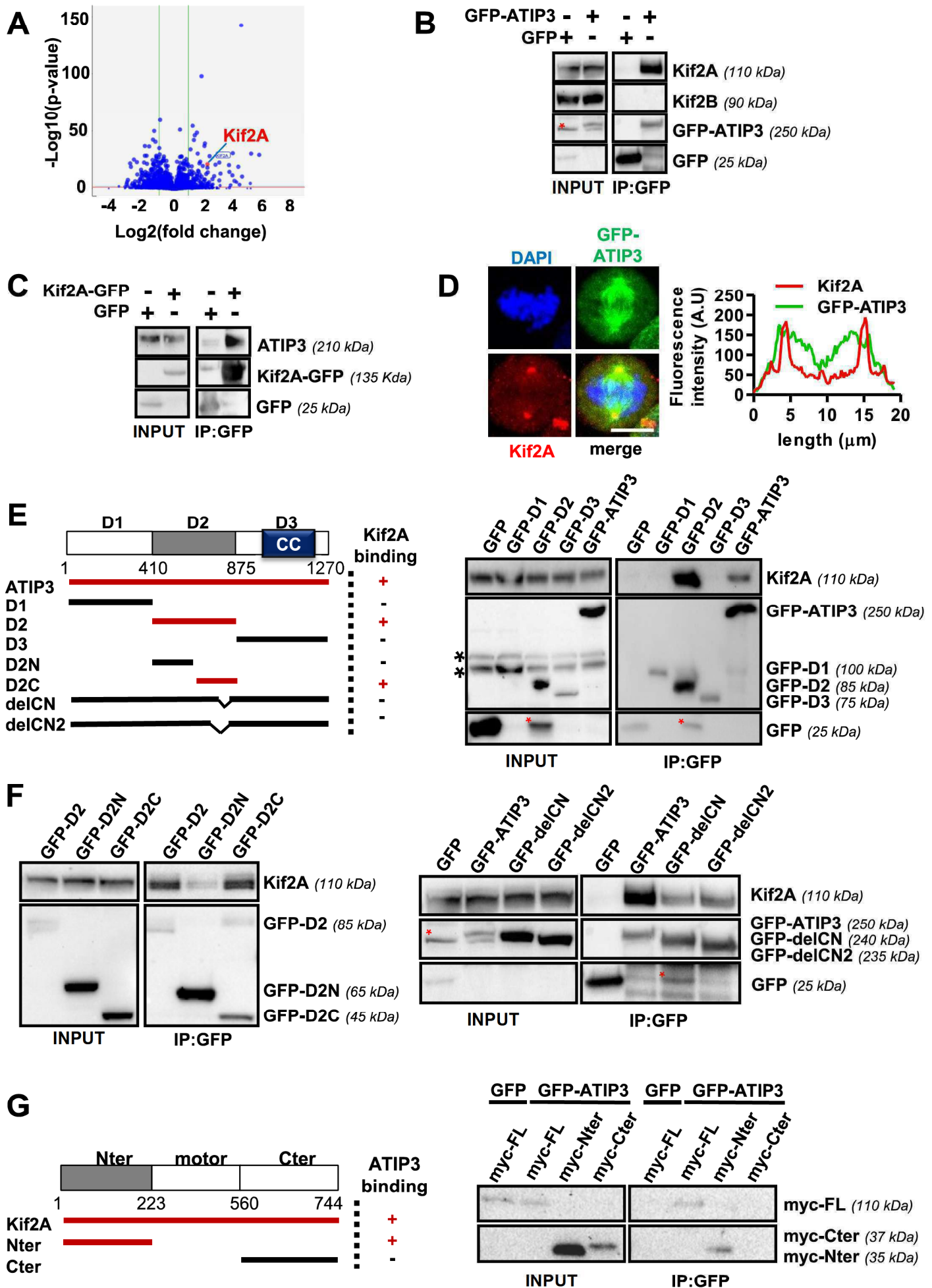


### Figure 1: ATIP3 silencing induces reduced mitotic spindle

**A.** Immunoblotting with anti-ATIP3 (MTUS1) antibodies shows silencing efficiency of two different ATIP3-specific siRNAs (siA#1 and siA#2) transfected in HeLa cells. Blots were reprobed with anti-vinculin antibodies for internal control.

**B.** Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected with control (siC), and two different ATIP3-specific siRNAs (siA#1 and siA#2) as indicated. Cells were stained with anti-pericentrin (red), anti-alpha-tubulin (gray) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10 μm. Pole-to pole distance was measured by drawing a line with ImageJ software between the two poles stained with pericentrin. Right panel shows quantification of spindle length in metaphase. Number of cells analyzed is under brackets. \*\*\*p<0.001.





## Figure 2: ATIP3 interacts with Kif2A

**A.** Volcano plot showing distribution of 145 proteins present in GFP-ATIP3 compared with GFP and identified by mass spectrometry. x axis =  $\log_2(\text{fold-change})$ , y axis =  $-\log_{10}(\text{p-value})$ . The horizontal red line indicates p value = 0.05, vertical green lines indicate absolute fold-change = 2.

**B.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-Kif2A, anti-Kif2B and anti-GFP antibodies to reveal Kif2A (110 kDa), Kif2B (90 kDa), GFP-ATIP3 (250 kDa) and GFP (25 kDa). A red asterisk indicates a non-specific band.

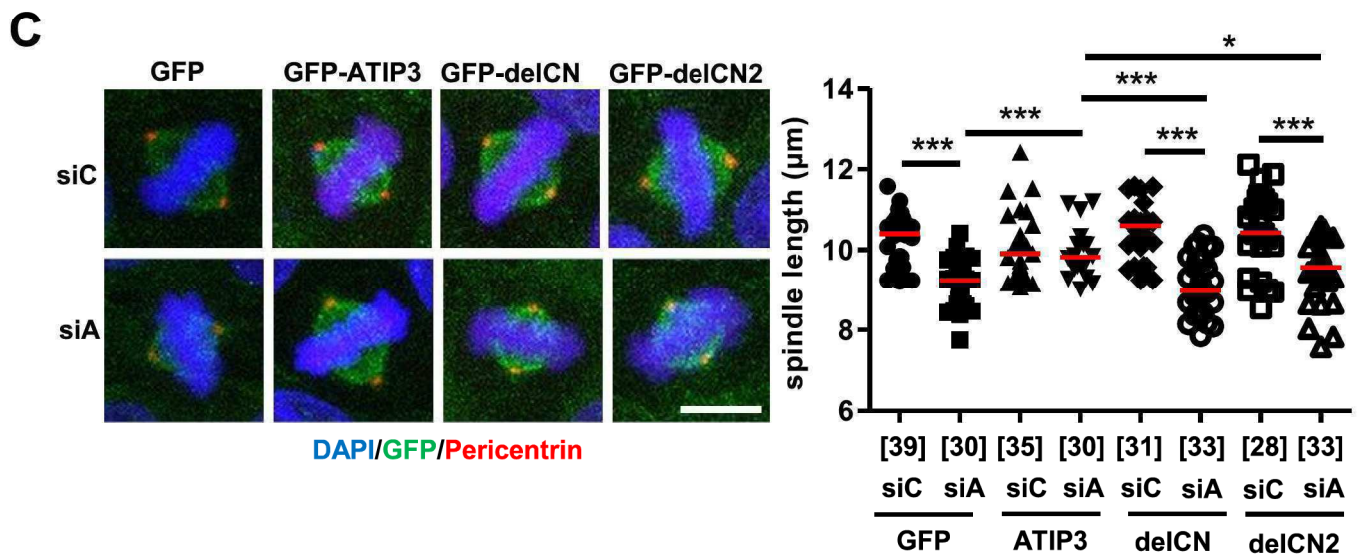
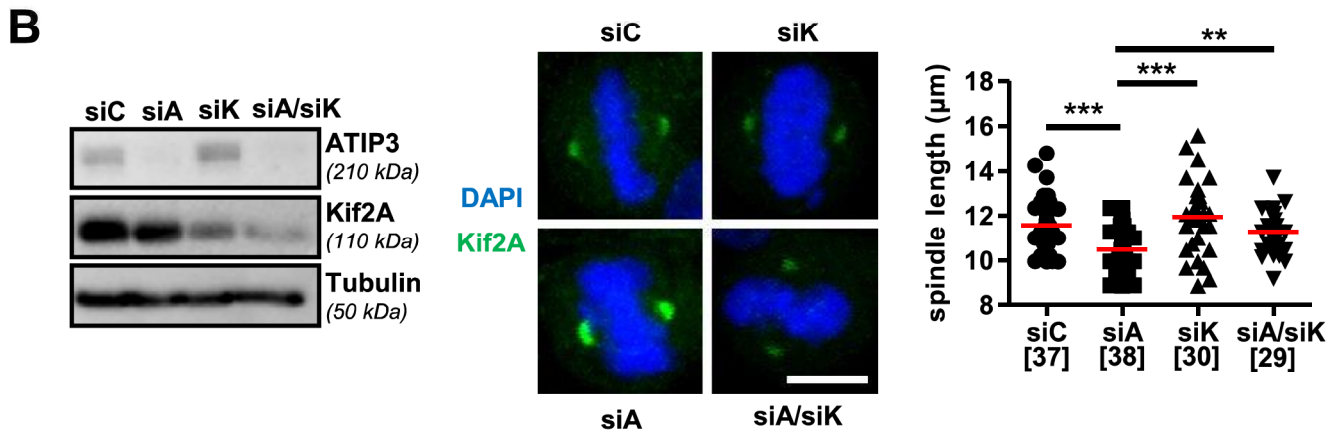
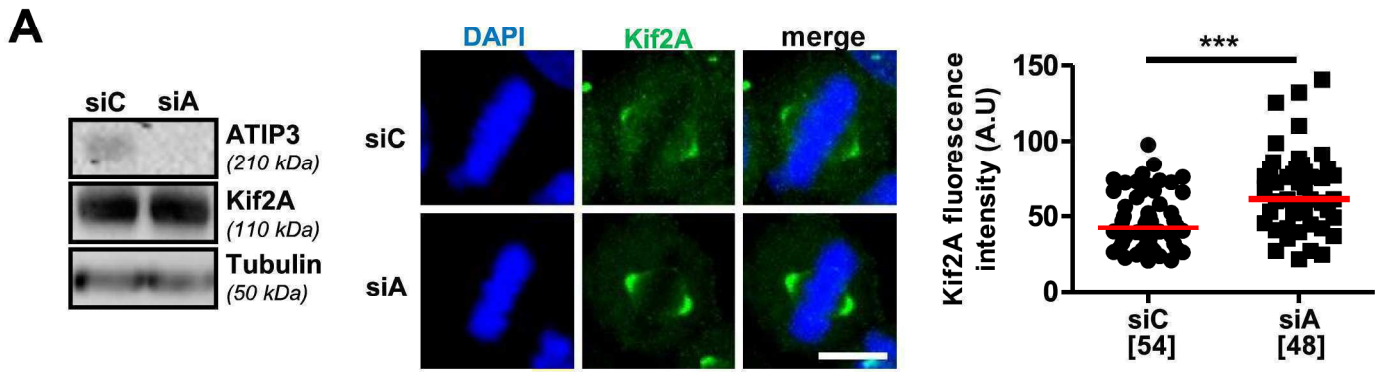
**C.** HeLa cells were transfected with Kif2A-GFP or GFP and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-ATIP3 (MTUS1) and anti-GFP antibodies.

**D.** HeLa cells were transfected with GFP-ATIP3, fixed and stained with anti-Kif2A (red) and anti-GFP (green) antibodies and DAPI (blue). Immunofluorescence imaging and linescan below show co-localization between Kif2A and ATIP3 at spindle poles.

**E.** Schematic representation of ATIP3 protein illustrating the position of D1, D2 and D3 regions. CC: coiled coil region. Amino acid numbering is from Accession number NP\_001001924. Schematic drawing of ATIP3 deletion mutants and their ability (+) or not (-) to bind Kif2A. Right panel: immunoprecipitation assay of MCF-7 cell lysates expressing GFP, GFP-ATIP3 or GFP-fused D1, D2, D3 regions. Blots were probed with anti-Kif2A and anti-GFP antibodies. A red asterisk indicates non-specific band corresponding to cleavage product of GFP-D2 and a black asterisk indicates signal from previous anti-Kif2A blotting.

**F.** MCF-7 cells were transfected with GFP-D2 fragments (left panel) or GFP-ATIP3 deletion mutants (right panel) and immunoprecipitation was performed using anti-GFP antibodies. Blots were probed as in E. Red asterisk: same legend as in E.

**G.** Schematic representation of Kif2A protein illustrating the N- terminal (N-ter) and C-terminal (C-ter) regions. Amino acid numbering is from Accession number NP\_001091981.1. Schematic drawing of Kif2A deletion mutants and their ability (+) or not (-) to bind ATIP3. Right panel: MCF-7 cells were co-transfected with GFP-ATIP3 or GFP and myc-Kif2A (myc-FL), or with GFP-ATIP3 and Kif2A deletion mutants myc-Nter and myc-Cter. Immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-myc antibodies.



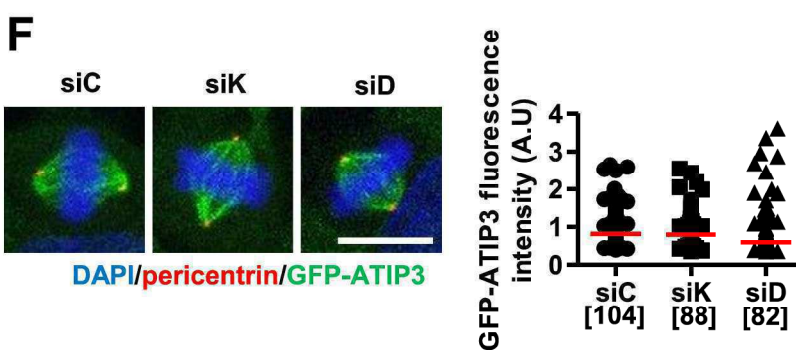
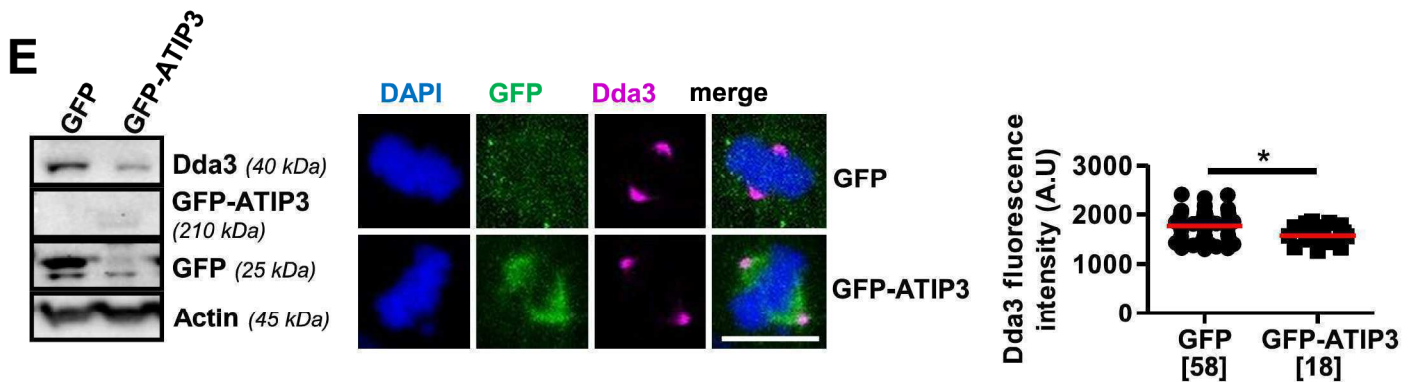
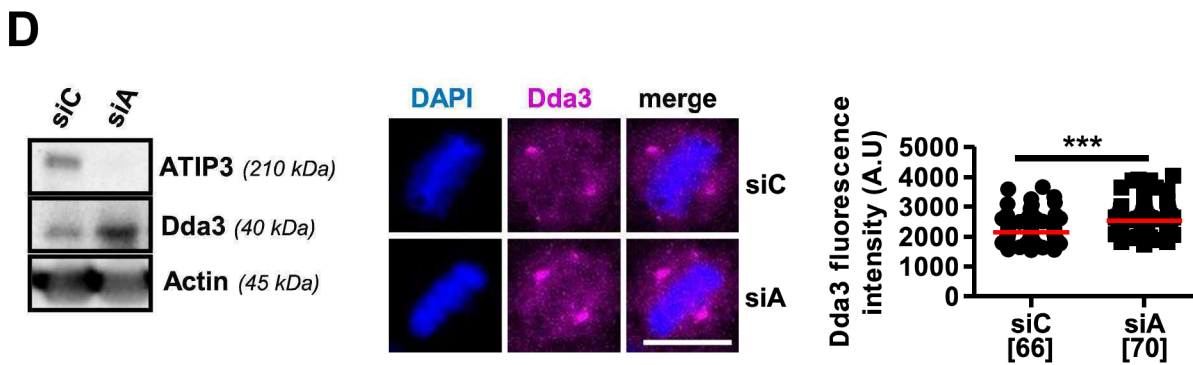
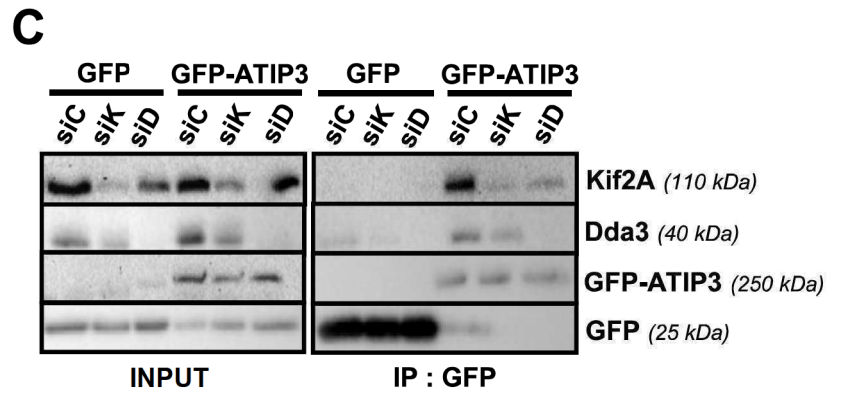
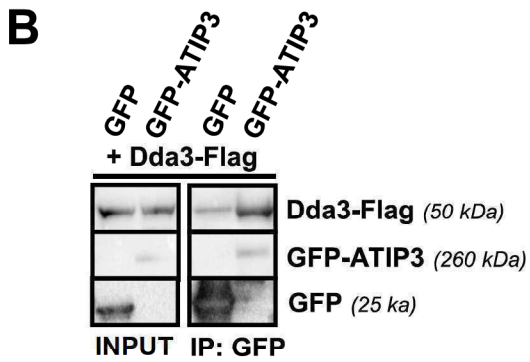
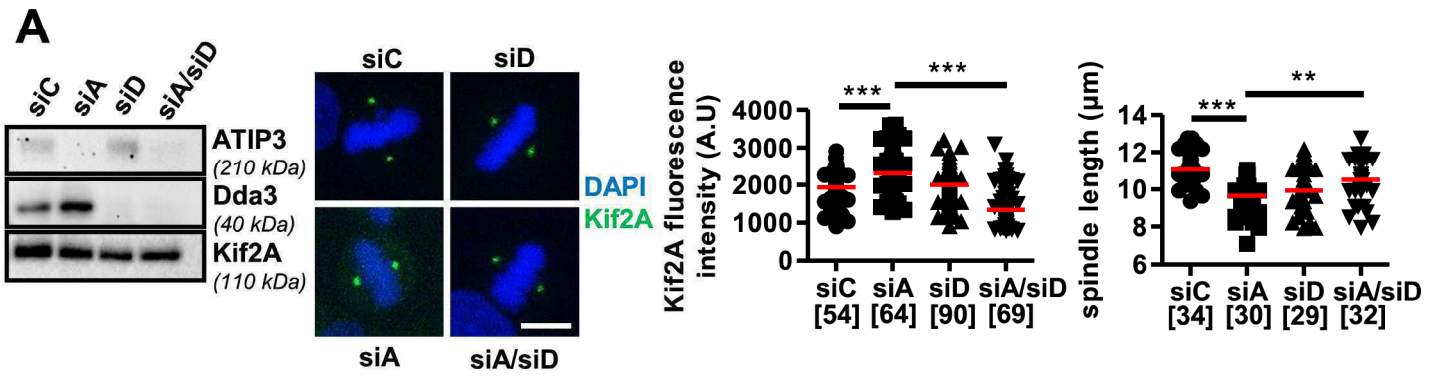
### **Figure 3: ATIP3 regulates Kif2A recruitment**

**A.** Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected with control (siC) or ATIP3-specific siRNA as indicated. Cells were fixed and stained with anti-Kif2A (green) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10 $\mu$ m. Silencing efficiency was assessed by immunoblotting with anti-MTUS1 (ATIP3) and anti-tubulin antibodies. Kif2A fluorescence intensity was measured by drawing a line with ImageJ software between the two poles and the maximum intensity values at the poles were collected. Quantification of Kif2A intensity in metaphase HeLa cells. Number of poles analyzed is under brackets. \*\*\* $p < 0.001$ .

**B.** Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected with control (siC), ATIP3-specific (siA) and/or Kif2A-specific (siK) siRNA as indicated, and stained as in (A). Scale bar, 10 $\mu$ m. Blots were probed as in A. Spindle length (pole-to-pole distance) was measured as in Figure 1B. Number of metaphase cells analyzed is under brackets. \*\*\* $p < 0.001$ .

**C.** Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected for 48h with control (siC), ATIP3-specific (siA) as indicated, then for 24h with GFP, GFP-ATIP3, or ATIP3 deletion mutants (GFP-delCN and GFP-delCN2) as indicated. Cells were stained with anti-GFP (green) and anti-pericentrin (red) antibodies and DAPI (blue). Spindle length was measured as in Figure 1B. Right panel shows quantification of spindle length in metaphase HeLa cells. Number of cells analyzed is under brackets. \*\*\* $p < 0.001$ .





#### **Figure 4: ATIP3 forms a complex with Kif2A and Dda3**

**A.** Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected with control (siC), ATIP3-specific (siA) or Dda3-specific (siD) siRNA as indicated. Cells were fixed and stained with anti-Kif2A (green) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10 $\mu$ m. Silencing efficiency was assessed by immunoblotting with anti-MTUS1 (ATIP3), anti-Dda3 and anti-Kif2A antibodies. Right panel: Quantification of Kif2A fluorescence intensity at the poles as in Figure 3 and of spindle length as in Figure 1B. Number of poles and cells analyzed is under brackets. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

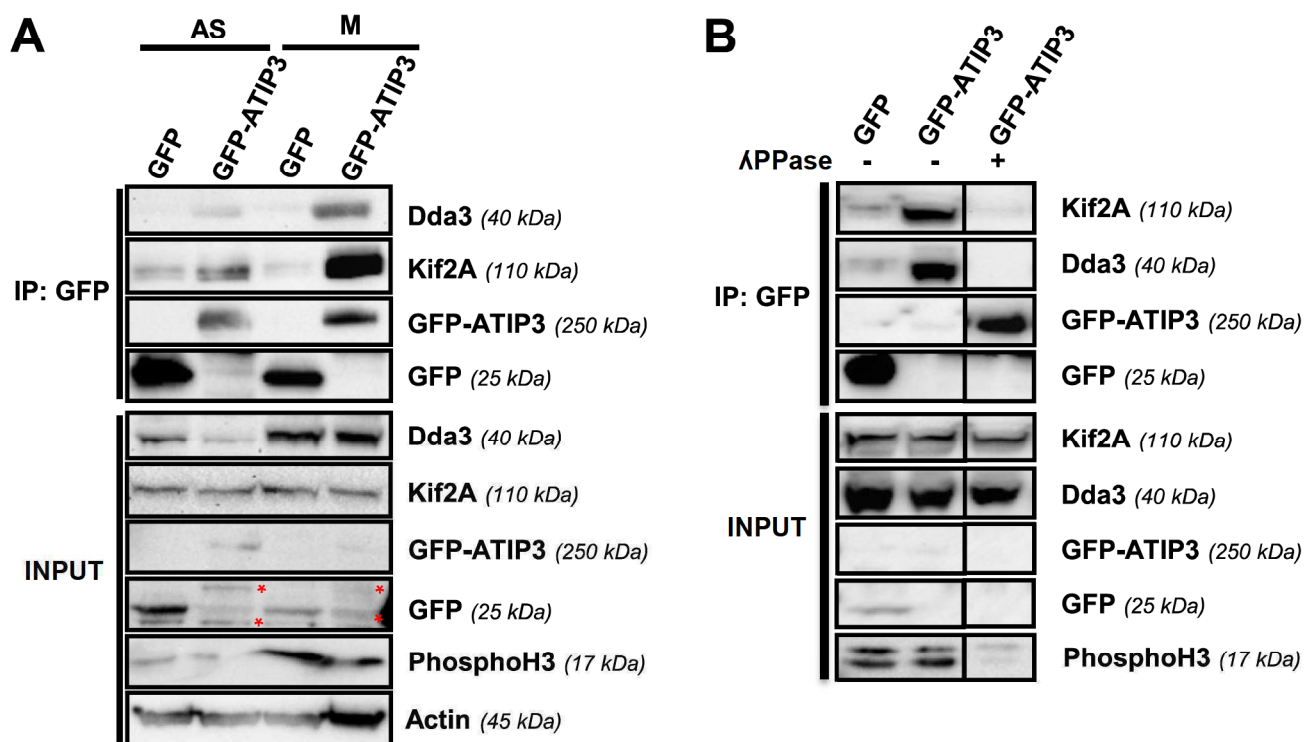
**B.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP and Dda3-Flag and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-Dda3 and anti-GFP antibodies.

**C.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP after being transfected for 48h with control (siC), Kif2A-specific (siK) and Dda3-specific (siD) siRNA, and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-Kif2A, anti-Dda3 and anti-GFP antibodies.

**D.** Anti-Dda3 (magenta) and DAPI (blue) immunostaining of HeLa cells transiently transfected with control (siC) and ATIP3-specific (siA) siRNA. Scale bar, 10 $\mu$ m. Silencing efficiency was assessed by immunoblotting with anti-MTUS1 (ATIP3), anti-Dda3 and anti-actin antibodies. Right panel: Dda3 fluorescence intensity at the poles was measured using ImageJ software. Shown is quantification of maximal Dda3 intensity in metaphase HeLa cells. Number of poles analyzed is under brackets. \*\*\*p<0.001.

**E.** Immunofluorescence imaging of MCF-7 cells stably expressing GFP or GFP-ATIP3 as indicated. Cells were fixed and stained with anti-GFP (green), anti-Dda3 (magenta) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10 $\mu$ m. Plasmid expression was checked by immunoblotting with anti-GFP, anti-Dda3 and anti-actin antibodies. Right panel: Dda3 fluorescence intensity at the poles was analyzed and quantified as in (B). Number of poles analyzed is under brackets. \*p<0.05.

**F.** Immunofluorescence imaging of HC6 cells stably expressing GFP-ATIP3 and transfected with control (siC), Kif2A-specific (siK) or Dda3-specific (siD) siRNA as indicated. Cells were fixed and stained with anti-GFP (green), anti-pericentrin (red) antibodies and DAPI (blue). Right panel: Quantification of GFP-ATIP3 intensity relative to pericentrin intensity at the poles. Number of poles analyzed is under brackets.

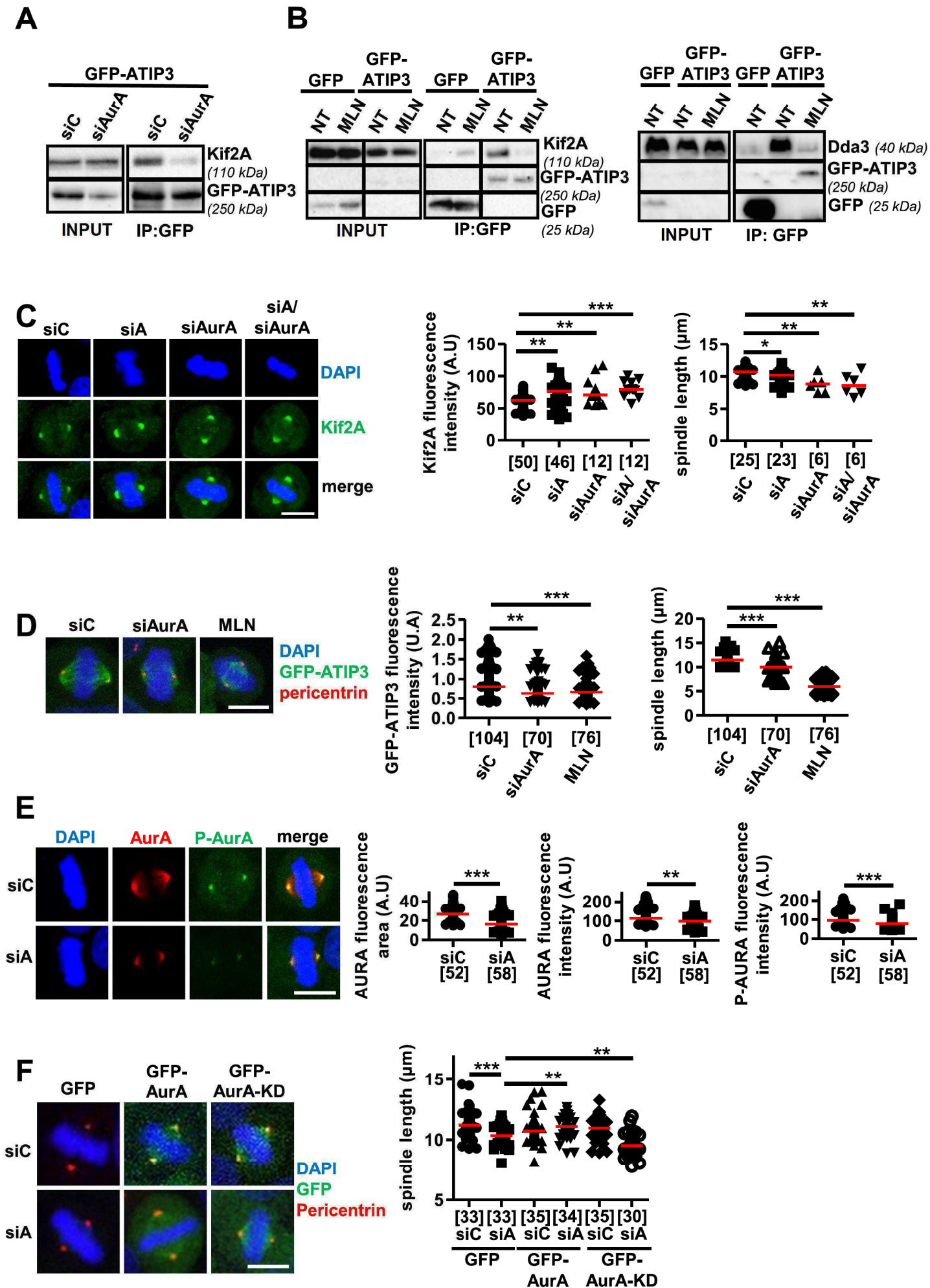


**Figure 5: ATIP3-Kif2A-Dda3 complex is regulated in mitosis**

**A.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP and left asynchronous (AS) or synchronized in mitosis (M). Immunoprecipitation was performed using anti-GFP antibodies. Blots were probed with anti-Dda3, anti-Kif2A, anti-GFP, anti-PhosphoH3 and anti-actin antibodies. An asterisk indicates cleavage product of GFP-ATIP3.

**B.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP and synchronized in mitosis. Lysates were treated with 2000 units of lambda phosphatase ( $\lambda$ PPase) and immunoprecipitation was performed using anti-GFP antibodies. Western blots were probed with anti-Kif2A, anti-Dda3, anti-phospho-histone H3 and anti-GFP antibodies.





### **Figure 6: Involvement of AurKA in the effects of ATIP3 silencing**

**A.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 (HC6 clone) and with control (siC) and AurA-specific (siAurA) siRNA, and immunoprecipitation was performed using anti-GFP antibodies. Western blots were probed with anti-Kif2A and anti-GFP antibodies.

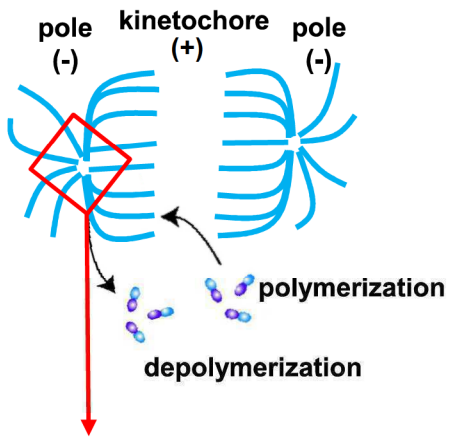
**B.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP, then treated with 500nM MLN8054 (MLN) (s1100, Selleckchem) or vehicle (DMSO) for 30 minutes at 37°C, and immunoprecipitation was performed using anti-GFP antibodies. Blots were probed as in A (left panel) and with anti-Dda3 and anti-GFP antibodies (right panel). **C.** HeLa cells were transfected with control (siC), ATIP3-specific (siA), and AurA-specific (siAurA) and staining with anti-Kif2A (green) and DAPI (blue) was performed. Scale bar, 10 µm. Right panel: Quantification of Kif2A intensity and pole-to-pole distance. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**D.** Immunofluorescence imaging of HC6 cells stably expressing GFP-ATIP3 and transfected with control (siC), AurA-specific (siAurA) siRNA or treated with 500nM MLN8054 (MLN) as indicated. Cells were fixed and stained with anti-GFP (green), anti-pericentrin (red) antibodies and DAPI (blue). Right panel: Quantification of GFP-ATIP3 intensity relative to pericentrin intensity at the poles and quantification of pole-to-pole distance. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

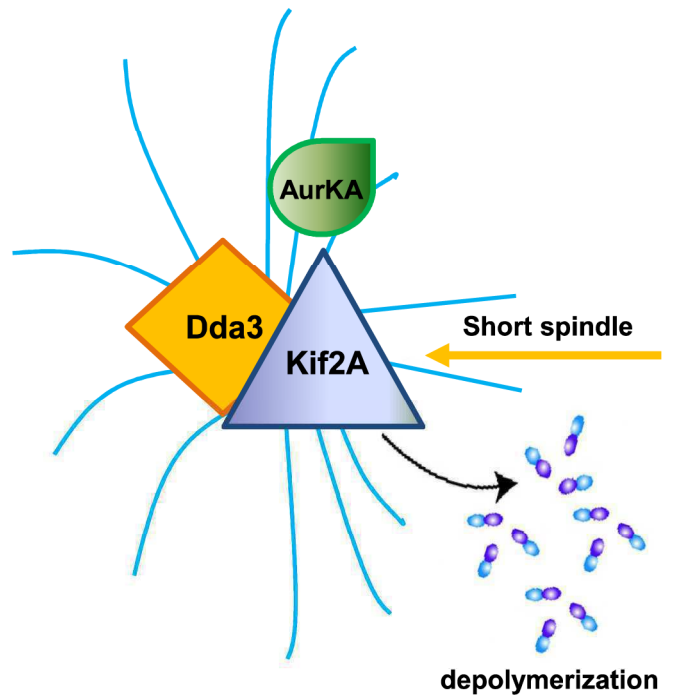
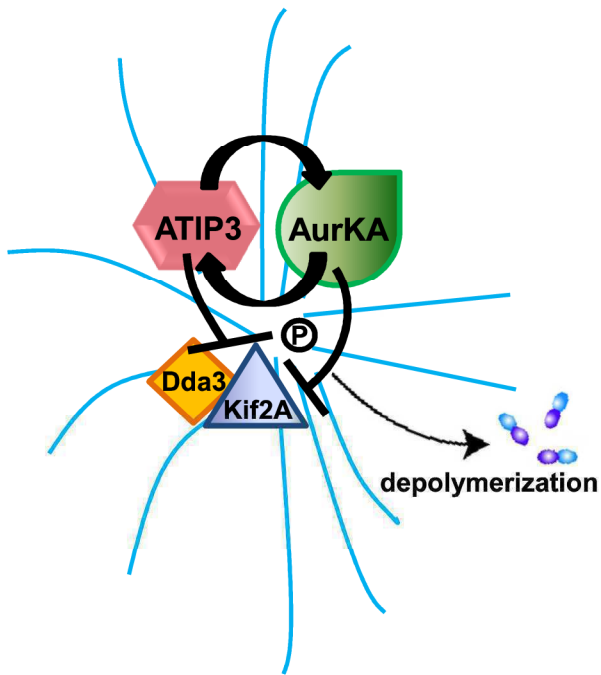
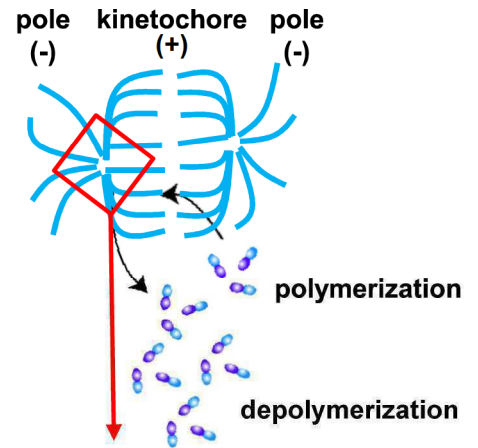
**E.** HeLa cells transfected with control (siC) or ATIP3-specific siRNA were fixed and stained with anti-AurA (red), anti-phospho-AurA (green) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10µm. AurA and P-AurA fluorescence intensity and AurA area were measured with ImageJ software. Right panel: Quantification of intensities and area in metaphase HeLa cells. Number of poles analyzed is under brackets. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**F.** Immunofluorescence imaging of HeLa transfected with control (siC) and ATIP3-specific (siA) siRNA and then with GFP, GFP-AurA and GFP-AurA-KD as indicated. Cells were fixed and stained with anti-GFP (green), anti-pericentrin (red) antibodies and DAPI (blue). Note that all GFP-fusion constructs are expressed at similar levels. Right panel: Quantification of pole-to-pole distance. Number of poles analyzed is under brackets. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**ATIP3-positive cell**



**ATIP3-negative cell**



**Figure 7: Negative regulation of Kif2A/Dda3 complex targeting by ATIP3 maintains metaphase spindle length in an AurKA-dependent manner**

The maintenance of the spindle size in metaphase is due to a balance between polymerization of MT plus ends (+) at the kinetochores and depolymerization of MT minus ends (-) at the poles. In ATIP3-positive metaphase cells, AurKA activity is required for ATIP3 localization at the spindle poles and stabilizes a molecular complex formed by ATIP3-Kif2A and Dda3. ATIP3 reciprocally contributes to AurKA targeting at the poles. ATIP3 acts as a brake that interacts with Kif2A and Dda3 to restrain their targeting at the spindle poles, thereby controlling Kif2A depolymerization activity, which in turn contributes to maintaining proper mitotic spindle size.

In ATIP3-silenced cells, the brake is released and Kif2A and Dda3 are free to accumulate at the poles. AurKA targeting at the poles is concomitantly decreased, which also increases Kif2A recruitment. These two converging mechanisms result in increased Kif2A MT-depolymerizing activity at the poles, which contributes to the formation of a short mitotic spindle in the absence of ATIP3.

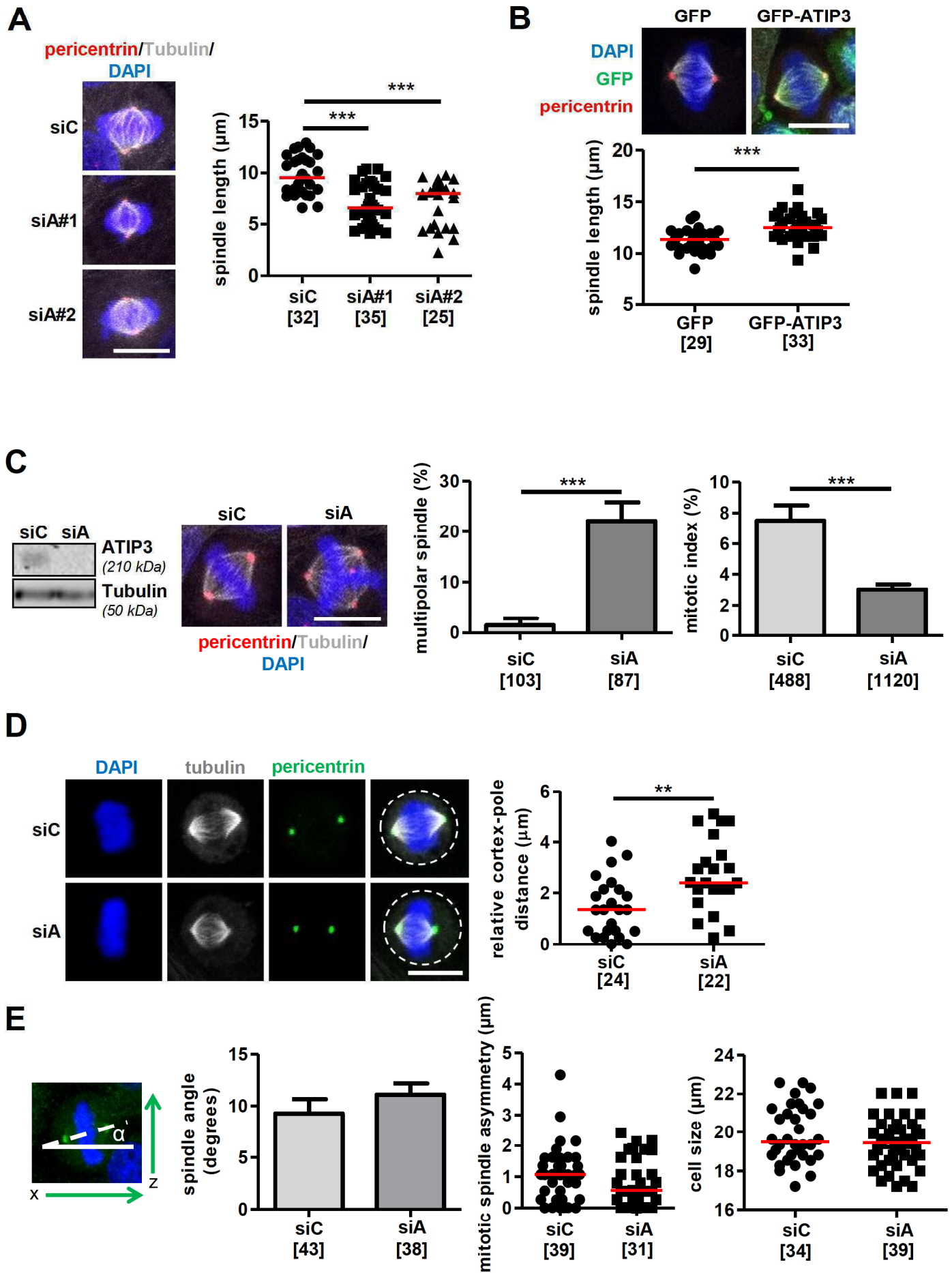


Gene & Synonyms	ATIP3/GFP			Description
	Ratio	Log2	p-value	
MTUS1	400,563902	8,6458886	4,2716E-51	Microtubule-associated tumor suppressor 1
TBCCD1	13,6959029	3,77567248	3,2558E-21	TBCC domain-containing protein 1
PCM1	4,92790341	2,30097398	6,9899E-19	Pericentriolar material 1 protein
KIF2A	4,86820741	2,28339063	8,1438E-22	Kinesin-like protein KIF2A
CENPB	3,58061441	1,84020717	1,35E-05	Major centromere autoantigen B
TUBB6	3,45212501	1,78748471	6,9563E-24	Tubulin beta-6 chain
TUBA4A	2,78607967	1,47823652	0,00032993	Tubulin alpha-4A chain
CDC45	2,55955576	1,35589344	3,5984E-07	Cell division control protein 45 homolog
TUBB3	2,53211069	1,34034047	2,8227E-14	Tubulin beta-3 chain
DOCK6	2,26059959	1,17670548	0,00495536	Dedicator of cytokinesis protein 6
CHAMP1	2,12271217	1,08590876	1,0626E-06	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1

**Table 1: List of ATIP3 interacting partners related to microtubule cytoskeleton and/or mitosis**

Immunoprecipitation was performed from MCF-7 cells transfected with GFP or GFP-ATIP3, using anti-GFP antibodies. GFP-ATIP3 binding partners were compared to GFP by using quantitative label-free mass spectrometry analysis performed from four replicates. Shown are the fold changes of 11 selected proteins among 145 proteins quantified by label-free quantitative analysis of GFP-ATIP3 versus GFP according to absolute fold change  $\geq 2$ , adjusted p-value of ratio significance  $\leq 0.05$  and more than 3 peptides. Proteins are listed by ratio order.





### **Supplementary Figure S1. ATIP3 induces mitotic defects**

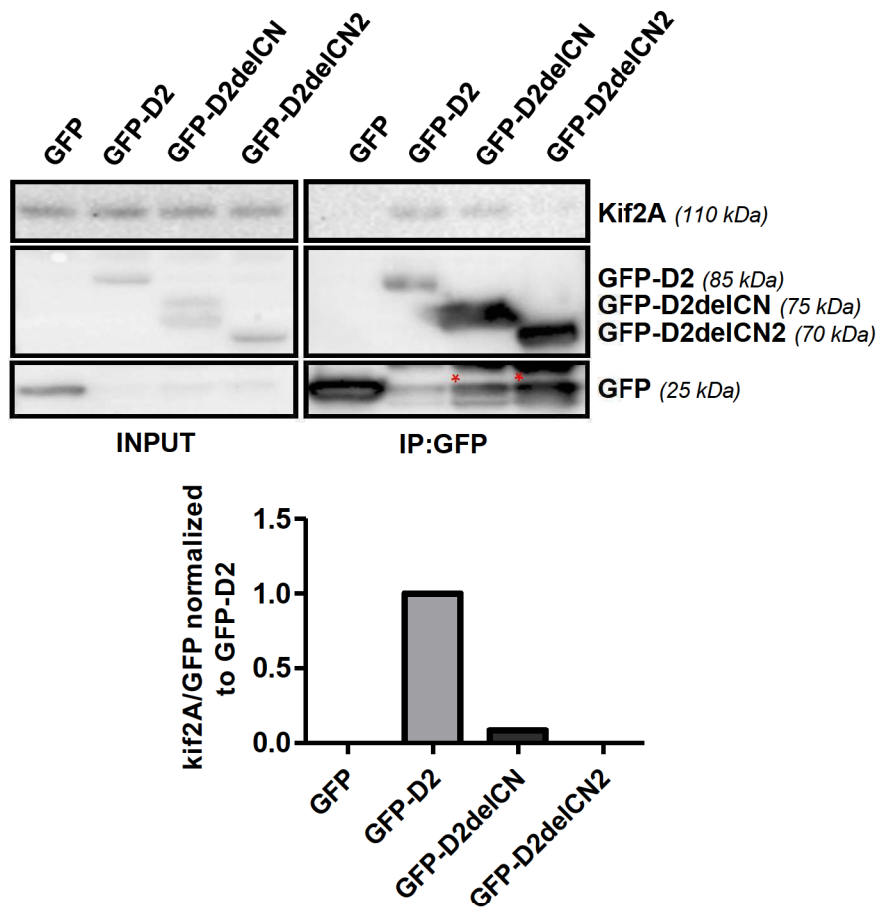
**A.** HCC1143 breast cancer cells were transfected with control (siC) and two different ATIP3-specific (siA#1 and siA#2), then synchronized with 50 ng/ml nocodazole for 16h and released for 45 minutes. Cells were fixed and stained with anti-pericentrin (red) and anti-alpha-tubulin (gray) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Spindle length was measured by drawing a line with ImageJ software between the two poles stained with pericentrin. Right panel: Quantification of pole-to-pole distance. Number of cells analyzed is under brackets. \*\*\* $p < 0.001$ .

**B.** MCF-7 cells stably expressing GFP-ATIP3 (HC6 clone) or GFP were synchronized with 50 ng/ml nocodazole for 16h and released for 45 minutes. Cells were fixed and stained with anti-pericentrin (red) and anti-GFP (green) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Right panel: Quantification of pole-to-pole distance as in (A). \*\*\* $p < 0.001$

**C.** HeLa cells were transfected with control (siC) and ATIP3-specific ATIP3#1 (siA) siRNA, then fixed and stained with anti-pericentrin (red) and anti-alpha-tubulin (gray) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Middle panel: Quantification of number of cells with multipolar spindle among cells in mitosis. Number of mitotic cells is under brackets. Right panel: Mitotic index (number of cells in mitosis relative to total number of cells). Total number of cells is under brackets. \*\*\* $p < 0.001$ .

**D.** HeLa cells were transfected with control (siC) and ATIP3-specific (siA) siRNA as in (C), then fixed and stained with anti-pericentrin (green) and anti-alpha-tubulin (gray) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Difference between the cortex-pole and pole-cortex distances was measured. Right panel: Quantification of mis-positioned spindle. Values closed to 0 correspond to a spindle centered in the middle of the cell. Number of cells analyzed is under brackets. \*\* $p < 0.01$ .

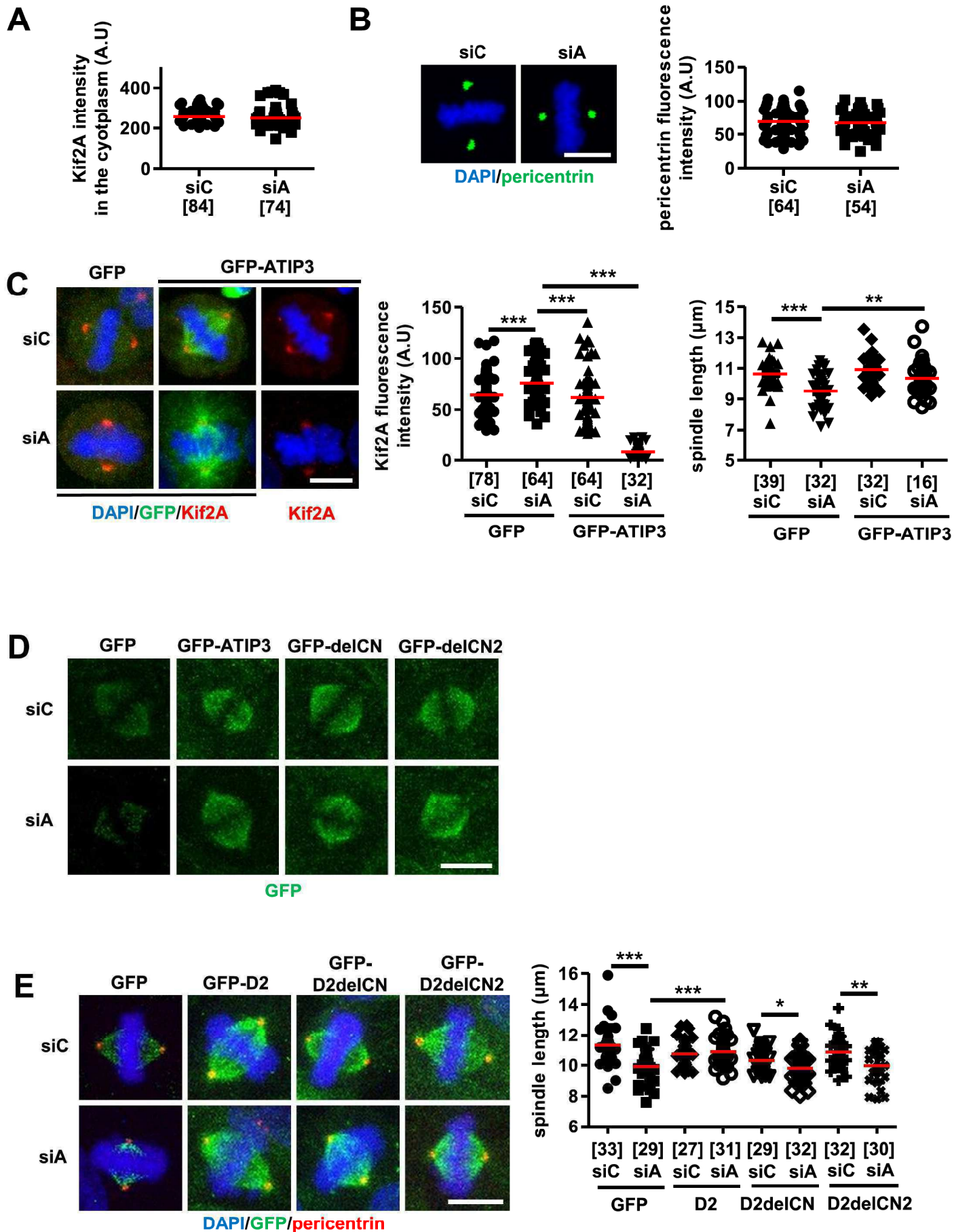
**E.** Left panel: Orthogonal view (x-z) of metaphase HeLa cells stained for pericentrin (green) and DAPI (blue) and quantification of spindle angle ( $\alpha$ ). Middle panel: Quantification of spindle asymmetry (Difference between the pole-kinetochore and kinetochore-pole distances). Right panel: quantification of cell size (diameter). Number of cells analyzed is under brackets.



### Supplementary Figure S2. GFP-D2 Deletion mutants do not interact with Kif2A

Upper panel: co-immunoprecipitation analysis of GFP-D2 mutants using anti-GFP antibodies. Blots were probed with anti-Kif2A and anti-GFP antibodies. An asterisk indicates cleavage product of GFP-D2delCN and GFP-D2delCN2. Lower panel: Quantification of Kif2A intensity relative to GFP fusion protein, normalized to Kif2A/GFP-D2.





### **Supplementary Figure S3. ATIP3-Kif2A interaction is functional**

**A.** HeLa cells were transfected for 48h with control (siC) or ATIP3-specific (siA) siRNA then fixed and stained with anti-Kif2A antibodies. Dot plot shows quantification of Kif2A intensity in the cytosol. Number of cells is under brackets.

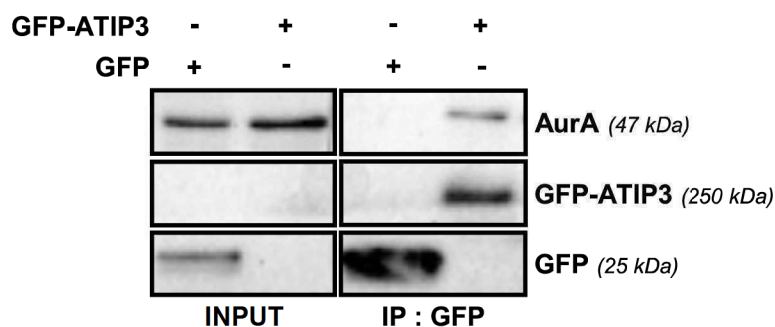
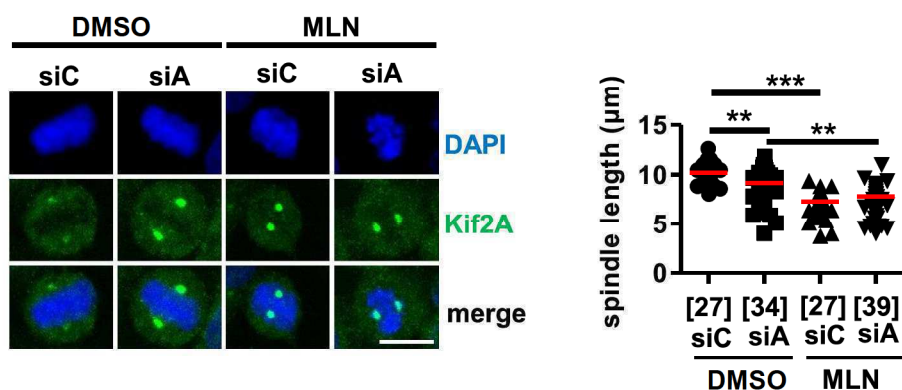
**B.** Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected control (siC) and ATIP3-specific (siA) siRNA, fixed and stained with anti-pericentrin (green) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Right panel: Quantifications of pericentrin intensity at spindle poles. Number of poles analyzed is under brackets.

**C.** ATIP3-silenced HeLa cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP, fixed and stained with anti-Kif2A (red) and anti-GFP (green) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Right panel shows quantifications of Kif2A intensity at poles and spindle length in metaphase HeLa cells. Number of cells analyzed is under brackets. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**D.** ATIP3-silenced HeLa cells were transfected with GFP (0.25  $\mu$ g), GFP-ATIP3 (3  $\mu$ g), GFP-ATIP3delCN (GFP-delCN) (3  $\mu$ g) and GFP-ATIP3delCN2 (GFP-delCN2) (3  $\mu$ g) as indicated. Fluorescence intensity of GFP immunostaining indicates similar levels of expression of all fusion proteins. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**E.** Immunofluorescence imaging of ATIP3-silenced HeLa cells transfected with control (GFP), GFP-ATIP3, or GFP-fused D2 deletion mutants (D2delCN and D2delCN2) as indicated. Cells were stained with anti-GFP (green) and anti-pericentrin (red) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10  $\mu$ m. Spindle length was measured as in Figure S1. Right panel shows quantification of spindle length in metaphase HeLa cells. Number of cells analyzed is under brackets. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**A****B****Supplementary Figure S4. ATIP3 silencing mimics AurKA inhibition**

**A.** MCF-7 cells were transfected with GFP-ATIP3 or GFP, and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-AurKA and anti-GFP antibodies.

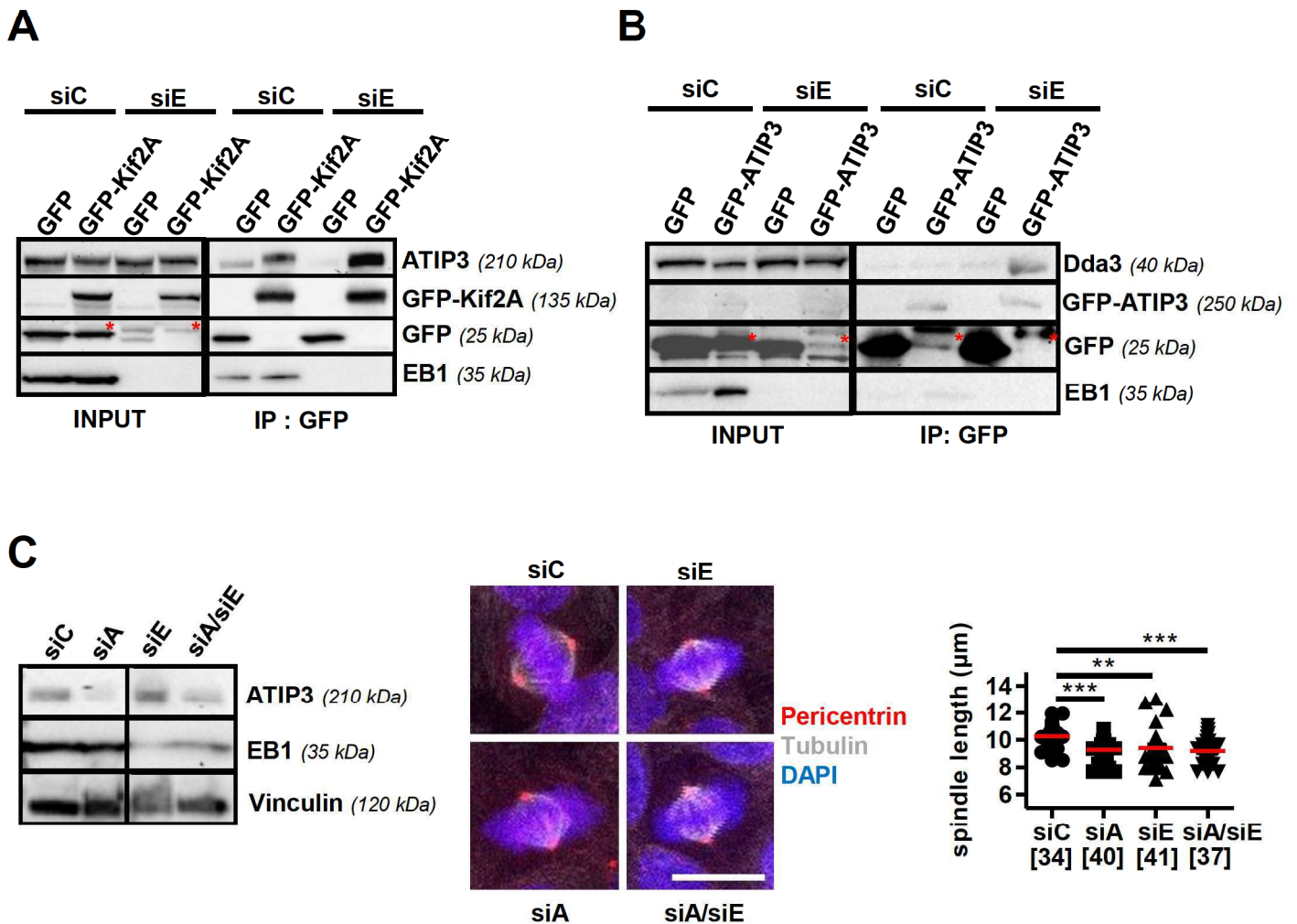
**B.** HeLa cells were transfected with control (siC) and ATIP3-specific (siA) siRNA, then treated with 500nM MLN8054 (MLN) (s1100, Selleckchem) or vehicle (DMSO) and staining with anti-Kif2A (green) and DAPI (blue) was performed. Scale bar, 10 µm. Right panel: Quantification of Kif2A intensity and pole-to-pole distance. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Gene & Synonyms	ATIP3/GFP			Description
	Ratio	Log2	p-value	
MTUS1,ATBP,ATIP,GK1,KIAA1288,MTSG1	400,5639	8,645889	4,27E-51	Microtubule-associated tumor suppressor 1
IFIT3,CIG-49,IFI60,IFIT4,ISG60	56,8503	5,829096	5,91E-30	Interferon-induced protein with tetatricopeptide repeats 3
WDR47,KIAA0893	38,79986	5,27798	5,64E-31	WD repeat-containing protein 47
SDCCAG8,CCCAP,NPHP10,HSPC085	37,63472	5,233992	4,76E-05	Serologically defined colon cancer antigen 8
SKP1,EMC19,OC2,SKP1A,TCEB1L	25,60329	4,678257	6,17E-11	S-phase kinase-associated protein 1
HERC2	24,35777	4,60631	3,3E-143	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2
MX2	22,6157	4,499253	0,000319	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2
PPP2R3B,PPP2R3L	21,34393	4,415754	1,95E-19	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B" subunit beta
USP18,ISG43	19,60479	4,293134	4,31E-06	Ubl carboxyl-terminal hydrolase 18
DDX60	17,74761	4,149553	3,38E-07	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60
IFIT1,G10P1,IFI56,IFNA11,ISG56	16,27501	4,024586	1,89E-31	Interferon-induced protein with tetatricopeptide repeats 1
IFIT2,CIG-42,G10P2,IFI54,ISG54	16,14121	4,012676	4,01E-12	Interferon-induced protein with tetatricopeptide repeats 2
OASL,TRIP14	14,88078	3,895378	0,001472	2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein
NEURL4,KIAA1787	13,94557	3,801735	4,08E-15	Neuralized-like protein 4
TBCCD1	13,6959	3,775672	3,26E-21	TBCC domain-containing protein 1
IFIH1,MDA5,RH116	9,193003	3,200536	9,54E-14	Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1
UBE2L6,UBCH8	8,887109	3,151714	0,003231	Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6
DDX58	8,611638	3,106288	3,12E-23	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58
RSL1D1,CATX11,CSIG,PBK1,L12	8,587754	3,102281	1,28E-07	Ribosomal L1 domain-containing protein 1
TRIM37,KIAA0898,MUL,POB1	7,1379	2,8355	2,06E-21	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM37
IFI16,IFNGIP1	6,80357	2,766292	2,58E-11	Gamma-interferon-inducible protein 16
OAS1,OIAS	6,395038	2,676953	0,000194	2'-5'-oligoadenylate synthase 1
IRF7	6,240895	2,641753	9,05E-09	Interferon regulatory factor 7
TRIM21,RNF81,RO52,SSA1	6,156449	2,622098	0,009359	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21
IDH2	5,950199	2,572938	0,02584	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
MX1	5,941575	2,570845	0,000997	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
BAG2	5,710763	2,513684	0,003495	BAG family molecular chaperone regulator 2
PARP14,BAL2,KIAA1268	5,432062	2,4415	9,22E-29	Poly [ADP-ribose] polymerase 14
ISG15,G1P2,UCRP	5,298326	2,405537	3,93E-06	Ubiquitin-like protein ISG15
IFI44,MTAP44	5,244952	2,39093	0,012223	Interferon-induced protein 44
PELP1,HMX3,MNAR	5,138508	2,36135	0,000374	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1
ZNF687,KIAA1441	5,136846	2,360883	0,00136	Zinc finger protein 687
ARID4A,RBBP1,RBP1	5,032783	2,331356	0,004618	AT-rich interactive domain-containing protein 4A
RALY,HNRPCL2,P542	5,022916	2,328525	0,000114	RNA-binding protein Raly
USP34,KIAA0570,KIAA0729	4,999018	2,321645	2,98E-05	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34
OAS3,P/OKcl.4	4,969608	2,313132	7,43E-15	2'-5'-oligoadenylate synthase 3
PCM1	4,927903	2,300974	6,99E-19	Pericentriolar material 1 protein
KIF2A,KIF2,KNS2	4,868207	2,283391	8,14E-22	Kinesin-like protein KIF2A
HIRA,DGCR1,HIR,TUPLE1	4,692289	2,230292	0,003969	Protein HIRA
SYCE2,CESC1	4,665367	2,22199	0,005421	Synaptonemal complex central element protein 2
HNRNPC,HNRPC	4,570855	2,192464	2,64E-13	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
SCAF1,SFRS19,SRA1	4,476672	2,162427	3,19E-05	Splicing factor, arginine/serine-rich 19
MIB1,DIP1,KIAA1323,ZZANK2	4,455159	2,155477	0,002535	E3 ubiquitin-protein ligase MIB1
F5	4,361252	2,124742	0,034239	Coagulation factor V
BRX1,BRX,BXDC2	4,337971	2,11702	1,8E-08	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog
USP9X,DFFRX,FAM,USP9	4,298583	2,103861	6,6E-40	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X
DDX21	4,215483	2,075698	1,44E-37	Nuclear RNA helicase 2
CCDC85C	4,200774	2,070655	1,53E-08	Coiled-coil domain-containing protein 85C
PRKD2,PKD2,HSPC187	4,109727	2,039043	1,19E-06	Serine/threonine-protein kinase D2
TRA2B,SFRS10	4,014425	2,005193	0,004845	Transformer-2 protein homolog beta
RBM28	3,98676	1,995217	0,036651	RNA-binding protein 28
SAMD9,C7orf5,DRIF1,KIAA2004,OEF1	3,958457	1,984938	0,025052	Sterile alpha motif domain-containing protein 9
HEATR1,BAP28	3,946628	1,980621	0,000673	HEAT repeat-containing protein 1
SAMHD1,MOP5	3,942591	1,979144	2,42E-20	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1
RALYL,HNRPCL3	3,82692	1,936184	0,001284	RNA-binding Raly-like protein
TRA2A	3,780993	1,918765	0,001382	Transformer-2 protein homolog alpha
DNAJC10,ERDJ5,UNQ495/PRO1012	3,741487	1,903612	0,000527	DnaJ homolog subfamily C member 10
PLSCR1	3,727927	1,898374	0,007216	Phospholipid scramblase 1
CLIL7,KIAA0076	3,704583	1,889311	0,000116	Cullin-7
HELZ2,KIAA1769,PRIC285	3,70085	1,887779	2,57E-98	Helicase with zinc finger domain 2
PARP10	3,674261	1,877454	5,21E-11	Poly [ADP-ribose] polymerase 10
IFI35,IFP35	3,584433	1,841745	0,025929	Interferon-induced 35 kDa protein
CENPB	3,580614	1,840207	1,35E-05	Major centromere autoantigen B
SRSF10,FUSIP1,FUSIP2,SFRS13A,TASR	3,569336	1,835656	0,001033	Serine/arginine-rich splicing factor 10
SSSCA1	3,469867	1,79488	1,23E-06	Sjoegren syndrome/scleroderma autoantigen 1
TUBB6	3,452125	1,787485	6,96E-24	Tubulin beta-6 chain
STAT2	3,44221	1,783335	9,05E-13	Signal transducer and activator of transcription 2
TOP2A,TOP2	3,415798	1,772222	1,11E-09	DNA topoisomerase 2-alpha
SRSF7,SFRS7	3,312654	1,727987	0,02374	Serine/arginine-rich splicing factor 7
IPO7,RANBP7	3,309	1,726395	2,15E-22	Importin-7
HMG20A,HMGX1,HMGXB1	3,292485	1,719177	0,029957	High mobility group protein 20A
LEM3,MAN1	3,271534	1,709967	0,006177	Inner nuclear membrane protein Man1
RFX7,RFXDC2	3,188194	1,67274	0,019881	DNA-binding protein RFX7
ACIN1,ACINUS,KIAA0670	3,18313	1,670446	1,81E-15	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus
MYBBP1A,P160	3,128068	1,645272	7,65E-08	Myb-binding protein 1A
IFIT5,ISG58,R158	3,119628	1,641374	2,78E-16	Interferon-induced protein with tetatricopeptide repeats 5
PARP12,ZC3HDC1	3,085375	1,625446	5,64E-31	Poly [ADP-ribose] polymerase 12
PARP9,BAL,BAL1	2,97479	1,572788	1,51E-11	Poly [ADP-ribose] polymerase 9
MATR3,KIAA0723	2,950173	1,5608	6,42E-49	Matrin-3
TDRD7,PCTAIRE2BP	2,947202	1,559346	2,64E-13	Tudor domain-containing protein 7
TCF20,KIAA0292,SPBP	2,943775	1,557667	0,001274	Transcription factor 20
ANKRD52	2,9331	1,552426	1,49E-11	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C
ZNFX1,KIAA1404	2,930555	1,551174	0,033095	NFX1-type zinc finger-containing protein 1
CDC40,EHB3,PRP17,PRPF17	2,924542	1,548211	0,016923	Pre-mRNA-processing factor 17
RIF1	2,903483	1,537785	4,75E-09	Telomere-associated protein RIF1
KIAA0020,XTF5	2,873872	1,522996	0,028583	Pumilio homolog 3
PRR35,C16orf11	2,852207	1,512078	0,042521	Proline-rich protein 35
VPS39,KIAA0770,TLP,VAM6	2,836824	1,504277	0,040128	Vam6/Vps39-like protein
PDCC11,KIAA0185	2,83199	1,501816	0,021921	Protein RRP5 homolog
TUBA4A,TUBA1	2,78608	1,478237	0,00033	Tubulin alpha-4A chain
ANKRD28,KIAA0379	2,771272	1,470548	2,52E-08	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A
YEATS2,KIAA1197	2,674265	1,419143	0,032127	YEATS domain-containing protein 2
STAT1	2,666222	1,414797	9,59E-47	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
RCN2,ERC55	2,602324	1,379801	4,73E-05	Reticuocalin-2
NOP2,NOL1,NSUN1	2,600893	1,379007	7,24E-08	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase
SON,C21orf50,DBP5,KIAA1019,NREBP,HSPC310,HSPC312	2,594627	1,375527	6,67E-43	Protein SON
MYO5C	2,570031	1,361786	3,5E-06	Unconventional myosin-Vc
CDC45,CDC45L,CDC45L2,UNQ374/PRO710	2,559556	1,355893	3,6E-07	Cell division control protein 45 homolog
ZC3H11A,KIAA0663,ZC3HDC11A	2,535122	1,342055	2,94E-08	Zinc finger CCHC domain-containing protein 11A
TUBB3,TUBB4	2,532111	1,34034	2,82E-14	Tubulin beta-3 chain
DTX3L,BBAP	2,52335	1,33534	3,66E-09	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L

ZC3H14	2,513254	1,329557	9,22E-10	Zinc finger CCH domain-containing protein 14
MED11,HSPC296	2,480172	1,31044	0,020791	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 11
WDR43,KIAA0007,UPT5	2,446519	1,29073	0,034537	WD repeat-containing protein 43
AHNAK2,C14orf78,KIAA2019	2,42864	1,280149	0,005458	Protein AHNAK2
SRHM2,KIAA0324,SRL300,SRM300,HSPC075	2,398405	1,262075	7,68E-55	Serine/arginine repetitive matrix protein 2
ZC3H13,KIAA0853	2,388416	1,256054	0,010231	Zinc finger CCH domain-containing protein 13
TGM2	2,371166	1,245596	1,88E-06	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
SMARCA5,SNF2H,WCRF135	2,346435	1,23047	4,52E-20	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5
SPATS2L,DNAPTP6,SP1224	2,344729	1,229421	5,48E-13	SPATS2-like protein
BAZ1A,ACF1,WCRF180,HSPC317	2,341266	1,227289	8,25E-16	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A
HNRNPDL,HNRPDL,JKTBP	2,335355	1,223642	0,037918	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
FHL2,DRAL,SLIM3	2,326949	1,21844	0,002534	Four and a half LIM domains protein 2
MLH1,COCA2	2,324722	1,217058	4,25E-13	DNA mismatch repair protein Mlh1
SYDE1	2,304438	1,204415	0,016566	Rho GTPase-activating protein SYDE1
FERMT2,KIND2,MIG2,PLEKHC1	2,280858	1,189576	0,020314	Fermitin family homolog 2
DOCK6,KIAA1395	2,2606	1,176705	0,004955	Dedicator of cytokinesis protein 6
KIAA1429,MSTP054	2,256016	1,173778	0,003569	Protein virilizer homolog
VPRBP,DCAF1,KIAA0800,RIP	2,231943	1,1583	9,37E-05	Protein VPRBP
TRIM26,HNF95,ZNF173	2,230249	1,157205	1,33E-06	Tripartite motif-containing protein 26
GLCLM,GLCLR	2,220323	1,150769	0,000285	Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit
WTAP,KIAA0105	2,220279	1,150741	1,73E-05	Pre-mRNA-splicing regulator WTAP
STUB1,CHIP,PP1131	2,211186	1,14482	0,000582	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
TBC1D1,KIAA1108	2,202403	1,139078	0,011648	TBC1 domain family member 1
MOV10,KIAA1631	2,19668	1,135325	1,33E-34	Putative helicase MOV-10
PHF2,CENP-35,KIAA0662	2,191994	1,132244	0,033822	Lysine-specific demethylase PHF2
ARHGEF11,KIAA0380	2,188603	1,13001	0,00377	Rho guanine nucleotide exchange factor 11
DTWD2	2,169846	1,117593	0,001011	DTW domain-containing protein 2
ATP5O,ATPO	2,156045	1,108387	0,035255	ATP synthase subunit O, mitochondrial
SETD1B,KIAA1076,KMT2G,SET1B	2,149421	1,103948	0,004608	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1B
CHAMP1,C13orf8,CAMP,CHAMP,KIAA1802,ZNF828	2,122712	1,085909	1,06E-06	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1
FARSB,FARSLB,FRSB,HSPC173	2,121072	1,084794	0,03784	Phenylalanine-tRNA ligase beta subunit
CAHAF1B,CAFI1A,CAF1P60,MPHOSPH7,MPP7	2,120143	1,084161	0,000552	Chromatin assembly factor 1 subunit B
MLLT10,AF10	2,112193	1,078742	0,003471	Protein AF-10
ELAVL1,HUR	2,096093	1,067703	8,43E-16	ELAV-like protein 1
FBLN1,PP213	2,093783	1,066112	0,004039	Fibulin-1
DCAF5,BCRG2,KIAA1824,WDR22	2,085175	1,060168	0,000204	DDB1- and CUL4-associated factor 5
ACAT1,ACAT,ACAT	2,064266	1,045629	0,017762	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
DNAJC3,P58IPK,PIPK1I	2,059893	1,042569	1,94E-06	DnaJ homolog subfamily C member 3
SAFB,HAP,HET,SAFB1	2,050192	1,035759	0,006039	Scaffold attachment factor B1
MED10,L6,TRG17,TRG20	2,041995	1,029979	0,00465	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10
KIAA1217,SKT	2,040098	1,028639	5,2E-13	Sickle tail protein homolog
NHSL1,C6orf63,KIAA1357	2,026184	1,018765	0,004756	NHS-like protein 1
AHNAK,PM227	2,005167	1,003722	1,8E-211	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK
TFDP1,DP1	2,001787	1,001288	0,01628	Transcription factor Dp-1

### **Supplementary Table S1. Label-free quantitative analysis of GFP-ATIP3 versus GFP**

Immunoprecipitation was performed from MCF-7 cells transfected with GFP or GFP-ATIP3, using anti-GFP antibodies. GFP-ATIP3 binding partners were compared to GFP by using quantitative label-free mass spectrometry analysis performed from four replicates. Shown are the fold changes of 145 proteins among 4591 proteins quantified. Absolute fold change  $\geq 2$  with adjusted p-value of ratio significance  $\leq 0.05$  and with  $\geq 3$  peptides were set as the threshold criteria for putative ATIP3 partners. Proteins are listed by ratio order.



**Supplementary Figure: EB1 regulates the ATIP3-Kif2A-Dda3 complex but is not involved in ATIP3-silenced effects on spindle length**

- A. HeLa cells were transfected with control (siC) and EB1-specific (siE) siRNA and transfected with Kif2A-GFP (or GFP) and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Blots were probed with anti-ATIP3 (MTUS1), anti-EB1 and anti-GFP antibodies. A red asterisk indicates a non-specific band.
- B. MCF-7 cells were transfected with control (siC) and EB1-specific (siE) siRNA and transfected with GFP-ATIP3 (or GFP) and immunoprecipitation was performed using anti-GFP. Western blots were probed with anti-Dda3, anti-EB1 and anti-GFP antibodies. A red asterisk indicates a non-specific band.
- C. Immunofluorescence imaging of HeLa cells transfected with control (siC), ATIP3-specific (siA) or EB1-specific (siE) siRNA as indicated. Cells were fixed and stained with anti-pericentrin (red), anti-tubulin (gray) antibodies and DAPI (blue). Scale bar, 10 $\mu\text{m}$ . Silencing efficiency was assessed by immunoblotting with anti-MTUS1 (ATIP3), anti-EB1 and anti-Vinculin antibodies. Pole-to-pole distance was measured by drawing a line with ImageJ software between the two poles stained with pericentrin. Right panel shows quantification of spindle length in metaphase HeLa cells. Number of cells analyzed is under brackets. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

# IV. Conclusions

## IV. Conclusions

Basé sur les travaux de mon équipe d'accueil montrant qu'ATIP3 est un biomarqueur pronostique de la survie des patientes et une nouvelle cible thérapeutique dans les cancers du sein les plus agressifs de sous-type triple-négatif, l'objectif de ma thèse a été d'élucider les mécanismes d'action anti-tumoraux d'ATIP3 en identifiant les partenaires d'interaction d'ATIP3.

Je me suis intéressée aux effets d'ATIP3 dans les cellules en interphase et en mitose, et j'ai mis en évidence l'existence de deux complexes moléculaires, ATIP3-EB1 et ATIP3-Kif2A-Dda3. Je me suis alors attachée à caractériser ces complexes moléculaires, puis à déterminer leurs mécanismes de régulation et enfin à étudier la pertinence de ces interactions dans le cancer du sein.

La caractérisation des complexes a permis de mettre en évidence une séquence d'interaction minimale, CN, présente dans le domaine central D2 d'ATIP3, commune aux interactions ATIP3-EB1 et ATIP3-Kif2A. Cette séquence est fonctionnelle car elle est nécessaire et suffisante pour empêcher *in vivo* l'accumulation d'EB1 à son site de liaison au bout (+) du MT et pour diminuer la polarité cellulaire en interphase. En mitose, la séquence CN est nécessaire pour restaurer les effets d'une déplétion d'ATIP3 sur la diminution de la taille du fuseau mitotique.

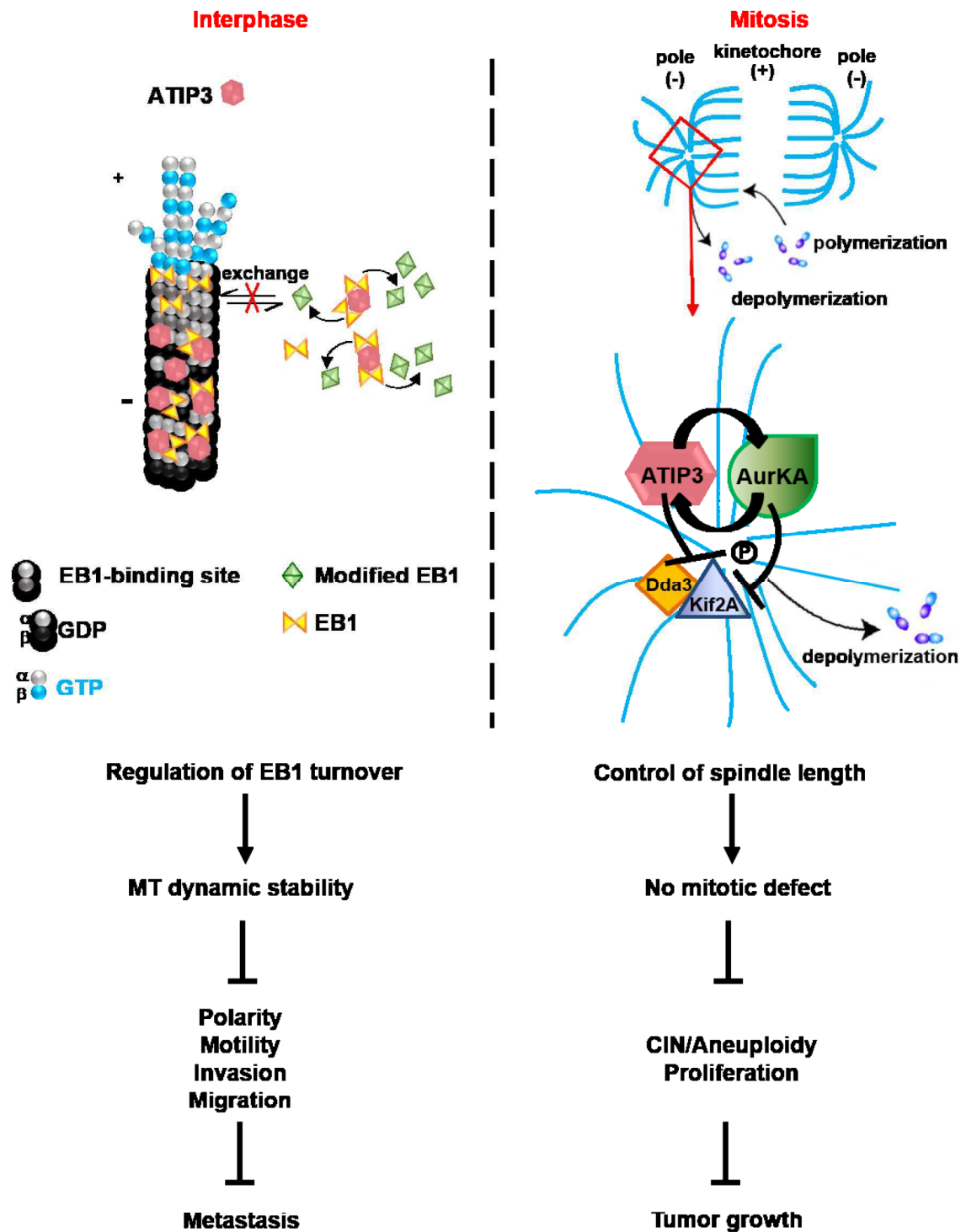
L'étude des mécanismes de régulation des partenaires d'ATIP3 ont permis de mettre en avant une régulation négative des fonctions d'EB1 au bout (+) des MTs, et de Kif2A/Dda3 au bout (-) des MTs, par interaction avec la protéine ATIP3. En effet, des expériences de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) ont montré qu'ATIP3 diminue la vitesse d'échange d'EB1 à son site de liaison au bout (+) du MT sans modifier sa diffusion dans le cytosol. Ceci souligne un nouveau mécanisme de régulation négative de la dynamique du MT par ATIP3. ATIP3 fait donc partie d'un groupe de MAPs structurales (incluant MAP-tau, MAP1B et MAP2) qui interagissent avec EB1 et qui la régulent de façon négative pour empêcher son accumulation au bout croissant du MT. En mitose, ATIP3 régule également de façon négative le recrutement de Kif2A et Dda3 au pôle du fuseau mitotique, engendrant une diminution de l'activité de dépolymérisation du MT par Kif2A, permettant ainsi le contrôle de la taille du fuseau mitotique en métaphase. Il pourrait

s'agir du même mécanisme par lequel ATIP3 contrôle le recrutement de Kif2A-Dda3. Comme pour EB1, ATIP3 diminuerait la dynamique d'échange du couple Kif2A/Dda3 au pôle, résultant en une diminution de l'activité de Kif2A. Nous explorons aujourd'hui cette hypothèse.

ATIP3 étant un biomarqueur pronostique de la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein, il était intéressant d'évaluer la pertinence fonctionnelle en clinique des complexes protéiques impliquant ATIP3 dans le cancer du sein. Du fait des effets oncogéniques d'EB1 et de la régulation négative d'ATIP3 sur les effets d'EB1, il serait possible que les effets délétères des forts niveaux d'expression d'EB1 soient modérés par de forts niveaux d'expression d'ATIP3 tandis que les tumeurs exprimant de forts niveaux d'EB1 et de faibles niveaux d'ATIP3 pourrait être les plus agressives. L'analyse de la combinaison des niveaux d'expression d'ATIP3 et EB1, au niveau transcriptomique et protéique, a permis d'identifier un groupe de tumeurs de haut grade très agressives exprimant de fort niveaux d'EB1 et de faibles niveaux d'ATIP3, qui représentent 20 à 30% de tous les cancers du sein et qui sont associés à des taux de survie réduits chez les patientes. Cette combinaison des deux biomarqueurs ATIP3 et EB1 pourrait améliorer le pronostic du cancer du sein par comparaison à EB1 seul et serait utile pour sélectionner les patientes susceptibles de bénéficier d'un traitement personnalisé. La pertinence du complexe ATIP3-Kif2A-Dda3 dans le cancer du sein reste à étudier.

L'ensemble de ces études a montré qu'ATIP3 était un régulateur négatif de ses partenaires d'interaction EB1 et Kif2A, et qu'elle constitue un frein pour contrôler certains processus cellulaires qui lorsqu'ils sont dé-régulés favorisent la progression des cancers. En interphase, ATIP3 régule la polarité, la motilité, l'invasion et la migration cellulaires en diminuant la dynamique du MT. En mitose, ATIP3 participe au maintien de la taille du fuseau mitotique en métaphase, permettant le bon déroulement de la division cellulaire. Ces résultats convergent pour rendre compte des effets anti-tumoraux et anti-métastatiques connus d'ATIP3 dans le cancer (**Figure 43**).





**Figure 43 :** Schéma de synthèse de la régulation négative d'EB1 en interphase et du complexe Kif2A/Dda3 en mitose par ATIP3. En interphase, ATIP3 réduit la dynamique d'échange d'EB1 à son site de liaison, probablement via une modification post-traductionnelle, engendrant une diminution de l'accumulation d'EB1 au bout croissant du MT et un changement dans la dynamique du MT. En mitose, AurKA est nécessaire à la localisation d'ATIP3 au pôle du fuseau et stabilise le complexe ATIP3-Kif2A-Dda3. Réciproquement, ATIP3 contribue au recrutement d'AurKA au pôle. En interagissant avec Kif2A et Dda3, ATIP3 agit comme un frein en diminuant leur recrutement au pôle, induisant une diminution de l'activité de dépolymerisation du MT par Kif2A, ce qui permet le maintien d'une taille correcte du fuseau mitotique. Ces deux mécanismes de régulation négative par ATIP3 résultent en une inhibition plusieurs processus cellulaires menant à la croissance tumorale et à la formation de métastases.

# V. Discussion et perspectives

## V. Discussion et perspectives

Ce projet de thèse a permis l'identification de partenaires d'interaction d'ATIP3 et les mécanismes d'action d'ATIP3 associés sur la dynamique microtubulaire et sur le maintien de la taille du fuseau mitotique. Bien qu'un remarquable avancement ait été réalisé sur la compréhension des effets anti-tumoraux d'ATIP3, il reste encore beaucoup de choses à explorer. Je vais dans un premier temps discuter de la régulation négative d'EB1 par ATIP3 en interphase, puis discuter des mécanismes associés aux effets d'ATIP3 sur la taille du fuseau mitotique et enfin évoquer les perspectives à long terme de ce projet.

### Régulation d'EB1 par ATIP3 au bout (+) des MTs

Nos résultats ont mis en évidence un nouveau mécanisme par lequel l'interaction ATIP3-EB1, ayant lieu dans le cytosol, réduit de façon indirecte la cinétique d'échange d'EB1 à son site de liaison au MT et ainsi provoque une régulation négative de la dynamique du MT au bout (+). Cependant l'interaction *in vitro* ATIP3-EB1 n'est pas suffisante pour réguler la localisation d'EB1 à l'extrémité (+), suggérant que la régulation négative d'EB1 par ATIP3 nécessite la présence d'autres composants cellulaires ou implique des modifications post-traductionnelles.

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui devra être évaluée dans des cellules exprimant ATIP3. Il a déjà été rapporté que la phosphorylation des protéines homologues d'EB1 chez la levure, Bim1 et Mal3, induit leur dissociation des MTs (Iimori et al., 2012; Zimniak et al., 2009). De plus, une phosphorylation d'EB1 par la voie Akt/GSK3 diminue son temps de vie sur son site de liaison (Le Grand et al., 2014). Ces études suggèrent l'hypothèse qu'ATIP3 pourrait induire une phosphorylation d'EB1. Il existe 17 sites potentiels de phosphorylation dans la séquence d'EB1 sur des résidus sérine/thréonine ou tyrosine (Hornbeck 2004 ; Chen 2014 ; article 2) mais peu ont déjà été validés. La phosphorylation d'EB1 par différentes kinases a pour conséquence d'augmenter ou de diminuer son interaction avec le bout plus des MTs. De façon intéressante, il a été montré que la kinase Src phosphoryle une protéine d'interaction d'EB1, la Cortactine, avec comme conséquence une diminution de son interaction avec EB1 (Duplan M 2014), ce qui ouvre la possibilité qu'ATIP3 puisse agir de façon indirecte

en régulant la phosphorylation d'un partenaire d'EB1. Pour évaluer si l'effet d'ATIP3 sur EB1 implique la régulation d'une activité kinase, un criblage de kinases pourrait être réalisé en utilisant différents inhibiteurs de kinases provenant d'une banque TOCRIS sur des cellules exprimant ou non ATIP3 et le nombre et la taille des comètes EB1 seraient alors analysés en immunofluorescence. Ceci permettrait de déterminer si ATIP3 régule la phosphorylation d'EB1 (ou d'une protéine intermédiaire), provoquant ainsi une délocalisation de la protéine EB1 aux bouts plus des microtubules. Une fois la ou les kinases identifiées, les résultats pourront être validés au niveau fonctionnel *in vitro* et *in vivo* en testant les inhibiteurs utilisés précédemment.

Pour déterminer si ATIP3 agit directement sur la phosphorylation d'EB1, des expériences d'immunoprécipitation suivi d'immunoblot anti-phosphoprotéines, une analyse phosphoprotéomique ou encore par radioactivité pourraient être réalisées dans des cellules exprimant ou non ATIP3.

En 2013, les travaux de Rovini et al. ont suggéré qu'une détyrosination la région C-terminale d'EB1 pourrait affecter son accumulation au bout croissant du MT, ainsi que ses fonctions sur la régulation de la dynamique du MT (Rovini et al., 2013). De plus, ce groupe a montré que la migration était augmentée dans des cellules de glioblastome contenant une forme d'EB1 détyrosinée, suggérant un rôle potentiel de la détyrosination d'EB1 dans la progression du cancer. Les cycles de tyrosination/détyrosination d'EB pourraient être évalués en utilisant des anticorps contre les formes tyrosinée et détyrosinée d'EB1 (Bosson et al., 2012) dans des cellules exprimant ou non ATIP3. Une modification dans la tyrosination d'EB1 dans des cellules déplétées en ATIP3 pourrait expliquer l'augmentation de la vitesse d'échange d'EB1 à son site de liaison au bout (+) du MT.

Même s'il n'a pas été démontré que l'acétylation d'EB1 réduit son accumulation au bout (+), l'évaluation de cette modification post-traductionnelle dans des cellules déficientes ou non en ATIP3 devrait être intéressante. De plus il a été montré qu'une acétylation d'EB1 perturbe l'alignement des chromosomes en métaphase (Xiao et al., 2012), il n'est donc pas impossible que cette modification post-traductionnelle d'EB1 joue un rôle dans un autre aspect de la mitose, comme sur la taille du fuseau mitotique.

Ces études sur les modifications post-traductionnelle d'EB1 permettront de préciser les mécanismes de régulation d'EB1 par ATIP3.

### **Mécanismes associés aux effets d'ATIP3 sur la taille du fuseau**

#### ***Mécanismes de régulation du complexe Kif2A-Dda3 par ATIP3***

Nos données ont mis en évidence une interaction entre ATIP3 et Kif2A et entre ATIP3 et Dda3. La perte de Dda3 ou de Kif2A empêche l'interaction ATIP3-Kif2A et ATIP3-Dda3 respectivement, ce qui a suggéré l'existence d'un complexe ATIP3-Kif2A-Dda3. De plus, une déplétion d'ATIP3 augmente le recrutement de Kif2A au pôle du fuseau et augmente la localisation et les niveaux d'expression de Dda3 indiquant une éventuelle stabilisation de Dda3 par ATIP3. A l'inverse une déplétion de Kif2A ou de Dda3 ne change pas la localisation d'ATIP3 au pôle. Ces résultats font d'ATIP3 un régulateur majeur du complexe Kif2A-Dda3. Il serait alors intéressant de déterminer les mécanismes par lesquels ATIP3 recrute le complexe Kif2A-Dda3 au pôle. Pour répondre à cette question, plusieurs possibilités peuvent être envisagées.

Un mécanisme de régulation négative de Dda3 par ASB7, une E3 ligase, a récemment été décrit par Uematsu et al. ASB7 interagit avec Dda3 et régule ses niveaux d'expression par une dégradation via le système ubiquitine-protéasome, menant à une diminution du recrutement de Kif2A au pôle (Uematsu et al., 2016). Basé sur nos résultats montrant une diminution des niveaux d'expression de Dda3 par ATIP3, nous pourrions envisager que cette diminution de Dda3 serait une conséquence d'une ubiquitination de Dda3 en présence d'ATIP3 engendrant une dégradation de Dda3 par le protéasome. Sachant que le complexe ATIP3-Kif2A-Dda3 nécessite la présence de Dda3, sa dégradation impacterait le recrutement de Kif2A au pôle. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, en présence ou non de MG132, l'inhibiteur du protéasome, dans des cellules déplétées pour ATIP3 ou surexprimant GFP-ATIP3 seraient à réaliser. Ces expériences permettront de déterminer si une perte d'ATIP3 stabilise Dda3 et au contraire qu'une surexpression d'ATIP3 induit une dégradation de Dda3. Il existe d'autres possibilités pour expliquer la régulation des niveaux de Dda3, telles qu'une régulation de son expression au niveau transcriptomique, qui serait également intéressant d'étudier.

Comme pour EB1, il est possible qu'ATIP3 régule le recrutement de Kif2A et Dda3 en modifiant leur dynamique au pôle. Nous avons montré qu'ATIP3, Kif2A et Dda3 étaient tous présents au pôle du fuseau et que le complexe était stabilisé en mitose. Or le recrutement de Kif2A et Dda3 est diminué par la présence d'ATIP3, ce qui suggère qu'ATIP3 modifie la vitesse d'échange de Kif2A et de Dda3 à leur site de liaison au pôle. Des expériences de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) sur des cellules déplétées ou non pour ATIP3 et transfectées avec GFP-Kif2A et GFP-Dda3 permettront de répondre à cette question. Dans cette idée, une déplétion d'ATIP3 accélérerait la vitesse d'échange de Kif2A et Dda3, et aurait pour conséquence d'augmenter leur recrutement au pôle. Ces résultats seraient similaires à ceux montrant qu'ATIP3 contrôle la vitesse d'échange d'EB1 à son site de liaison au bout (+) des microtubules.

Le complexe Kif2A-Dda3 pourrait être régulé par ATIP3 par l'intermédiaire d'autres protéines présentes au pôle du fuseau. Il est connu que Kif2A n'est pas seulement recrutée par Dda3 au pôle mais également par la dynéine et NuMA (Gaetz and Kapoor, 2004), cependant le recrutement de Dda3 par ces deux protéines n'a pas été exploré. Il serait alors intéressant de d'étudier si la dynéine et NuMA participent aux effets sur le recrutement de Kif2A et Dda3 induite par la déplétion d'ATIP3. En co-déplétant ATIP3 et la dynéine ou en exprimant son dominant négatif (le domaine C-terminal de p150<sup>glued</sup>) dans des cellules nous pourrions répondre à cette question. Si une déplétion de la dynéine restaure les effets d'une perte d'ATIP3 sur les intensités de Kif2A et Dda3 au pôle, la dynéine serait impliquée dans le recrutement du complexe par ATIP3. La même chose serait à réaliser avec NuMA. Comme réalisé avec Kif2A et Dda3, il serait intéressant de déterminer si ATIP3 régule le recrutement de la dynéine et de NuMA et à l'inverse de déterminer si la dynéine et NuMA ont un impact sur la localisation d'ATIP3 au pôle. Nous saurions alors si ATIP3 régule la dynéine et NuMA pour recruter Kif2A et Dda3 ou si elles se régulent réciproquement.

Ces études permettraient de comprendre comment ATIP3 régule le complexe Kif2A-Dda3 et leur recrutement au pôle du fuseau mitotique.

### ***Mécanisme de régulation de la taille du fuseau mitotique par ATIP3***

Notre étude a démontré qu'ATIP3 maintenait la taille du fuseau mitotique en inhibant le recrutement de Kif2A et Dda3 au pôle, cependant le mécanisme par lequel ATIP3 régule la taille du fuseau n'a pas encore été élucidé.

Kif2A est connue pour exercer son activité de dépolymérisation des MTs au pôle du fuseau et une déplétion de Kif2A engendre une augmentation de la taille du fuseau (Ganem and Compton, 2004). Nous pourrions explorer l'hypothèse selon laquelle ATIP3 régule directement la taille du fuseau mitotique via l'activité de Kif2A. Pour cela, il serait important dans un premier temps de déterminer si l'interaction ATIP3-Kif2A (et ATIP3-Dda3) est directe *in vitro*. Nous mesurons ensuite l'effet d'ATIP3 sur cette activité de dépolymérisation des MTs dans des expériences *in vitro* en présence de microtubules et des protéines Kif2A et ATIP3 purifiées. Selon notre hypothèse, la présence des deux protéines Kif2A et ATIP3 devrait diminuer la dépolymérisation des MTs. Nous pourrions alors conclure qu'ATIP3 a deux effets : recruter Kif2A au pôle et jouer sur son activité de dépolymérisation des MTs. Ces deux mécanismes expliqueraient le contrôle de la taille du fuseau mitotique par ATIP3.

Un autre mécanisme par lequel ATIP3 maintient la taille du fuseau mitotique en métaphase pourrait être le flux de MTs dirigés vers les pôles. Ce processus qui permet le maintien de la taille du fuseau, décrit au chapitre **I.2.4.5**, est dû à une translocation des MTs vers les deux pôles, couplée à une balance entre polymérisation au bout (+) aux kinétochores et dépolymérisation au bout (-) au pôle. Par ailleurs il est connu qu'une déplétion de Kif2A engendre une forte diminution du flux de MTs (Ganem et al., 2005). Des expériences de vidéomicroscopie dans des cellules transfectées avec une forme photo-activable de la GFP-tubuline (PA-GFP-tub) et exprimant ou non ATIP3 permettrait de valider cette hypothèse. Le déplacement des microtubules des kinétochores vers les pôles serait mesuré après illumination d'une région d'intérêt. Pour aller plus loin dans cette démarche et déterminer si l'augmentation de Kif2A au pôle par une déplétion d'ATIP3 engendre une modification du flux de MTs vers les pôles, ces mêmes expériences seraient à réaliser dans les cellules exprimant ou non ATIP3 et Kif2A.

Le flux de MTs vers les pôles est dû à un équilibre entre une dépolymérisation des MTs au pôle et une polymérisation au kinétochore, c'est pourquoi nous pourrions envisager l'hypothèse qu'ATIP3 ne régule pas seulement Kif2A au bout (-) mais aussi les protéines régulatrices du bout (+) aux kinétochores, telles que CLASP1. Dans un premier temps, il serait important de déterminer si ATIP3 s'associe au kinétochore grâce à un immunomarquage CREST dans des cellules exprimant la protéine GFP-ATIP3. CLASP1 favorise la polymérisation des MTs au kinétochores et coopère avec Kif2A pour maintenir une taille constante du fuseau. Il serait alors ensuite intéressant d'élucider si la déplétion d'ATIP3 a un effet sur CLASP1. Si c'est le cas, nous nous attendrions à observer soit aucun changement soit une diminution du recrutement de CLASP1 aux kinétochores, ce qui diminuerait son activité de polymérisation des MTs, et couplée à l'augmentation de l'activité de Kif2A, ceci résulterait en une réduction de la taille du fuseau en absence d'ATIP3.

Sachant que CLASP1 est un partenaire bien connu d'EB1, nous pourrions nous attendre à l'existence d'un complexe ATIP3-EB1-CLASP1 ou au contraire à une compétition entre EB1 et CLASP1 pour interagir avec ATIP3, comme nous l'avons montré pour EB1 et Kif2A/Dda3.

### ***Régulation réciproque d'ATIP3 et AurKA***

Nos résultats ont démontré qu'une déplétion d'ATIP3 diminuait le recrutement d'AurKA au pôle et mimait les effets de sa déplétion ou de son inhibition sur le recrutement de Kif2A au pôle et sur la taille réduite du fuseau mitotique. Une étude qui s'en rapproche le plus est celle montrant qu'Astrin, une protéine associée au fuseau mitotique et au pôle, interagit avec AurKA. Comme pour la déplétion d'ATIP3, une perte d'Astrin diminue la localisation d'AurKA sur le fuseau et mime les effets d'une déplétion d'AurKA sur l'arrêt mitotique, cependant AurKA n'a pas d'effet sur la localisation d'Astrin, contrairement à ATIP3. De plus une co-déplétion des deux protéines induit le même phénotype qu'une déplétion d'AurKA seule, faisant d'Astrin un régulateur d'AurKA (Du et al., 2008). Dans notre cas, ATIP3 expose le même phénotype qu'AurKA, ce qui est contradictoire car ATIP3 est un suppresseur de tumeur et AurKA est décrit comme un oncogène.

D'autres suppresseurs de tumeurs ont déjà été décrits comme étant des régulateurs d'AurKA. La protéine du point de contrôle mitotique, Chfr, et Fbxw7 (F-box/WD repeat-



containing protein 7), un tumeur suppresseur dépendant de p53, interagissent avec AurKA, l'ubiquitine et la dégradation via le protéasome (Yu et al., 2005; Kwon et al., 2012). Cependant, à l'inverse d'ATIP3, la déplétion de Fbxw7 augmente l'expression d'AurKA (Kwon et al., 2012).

Nos résultats ont démontré une régulation réciproque d'ATIP3 et AurKA ; en effet une déplétion d'ATIP3 diminue la localisation d'AurKA et de sa forme phosphorylée au pôle et sur le fuseau mitotique et à l'inverse une inhibition d'AurKA diminue la localisation d'ATIP3 au pôle. Les études ayant rapporté de telles régulations croisées sont rares et c'est le cas pour p53 et AurKA qui interagissent ensemble. Les effets induits par AurKA sur l'amplification des centrosomes sont diminués par p53 (Chen et al., 2002) et à l'inverse AurKA phosphoryle p53 et inhibe son activité et promeut sa dégradation (Katayama et al., 2001; Liu et al., 2004). Cependant il s'agit ici d'une régulation réciproque négative et non positive comme pour ATIP3 et AurKA.

Une régulation réciproque positive avec AurKA implique des protéines ayant des effets oncogéniques, telles que LIMK2 (LIM Domain Kinase 2) et TPX2. La kinase LIMK2 régule positivement les niveaux d'AurKA et à l'inverse AurKA régule l'activité kinase de LIMK2. Cette dernière est un régulateur clé des effets oncogéniques d'AurKA (Johnson et al., 2012). TPX2, comme présenté au chapitre **I.2.5.3** de l'introduction, est une MAP qui interagit avec AurKA et qui la recrute au pôle du fuseau. TPX2 est à la fois un activateur d'AurKA mais également son substrat (Kufner et al., 2003). La phosphorylation de TPX2 par AurKA permet le maintien de la taille du fuseau mitotique en régulant le flux de MT (Fu et al., 2015). Par ailleurs, ATIP3 possède plusieurs sites de phosphorylation par AurKA et pourrait éventuellement être un substrat d'AurKA, comme TPX2. Pour vérifier cette hypothèse, des tests d'activité kinase *in vitro* avec les protéines recombinantes ATIP3, AurKA et son mutant inactif AurKA-KD seraient à réaliser.

Toutes ces études montrent qu'AurKA et les suppresseurs de tumeurs suppresseurs ont des effets opposés. Les études montrant une régulation réciproque positive concernent des protéines ayant des effets oncogéniques. De façon inattendue, nous mettons en évidence dans notre étude une régulation réciproque positive entre ATIP3, un tumeur suppresseur et AurKA. Il aurait été moins surprenant de trouver, comme pour p53, une régulation réciproque négative.

Des résultats préliminaires du laboratoire ont montré des effets inhibiteurs du MLN8054, l'inhibiteur spécifique d'AurKA, sur la prolifération, la migration et la polarité cellulaire, ainsi que sur la taille des comètes EB1 dans des cellules déficientes en ATIP3. Ces effets du MLN8054 sont plus importants dans les cellules déficientes en ATIP3 que dans les cellules contrôle, suggérant que l'activité d'AurKA restaure les effets induits par une perte d'ATIP3 en interphase. Une déplétion d'ATIP3 a alors des effets opposés à l'inhibition d'AurKA par le MLN8054, ce qui est contradictoire avec nos données en mitose montrant qu'une déplétion d'ATIP3 mime les effets d'une déplétion ou d'une inhibition d'AurKA. Ces observations sont confortées par les conclusions antérieures établies à partir des études présentées au chapitre I.2.5.4 (Lee et al., 2006; Lu et al., 2008) mettant en évidence qu'une perte d'AurKA pouvait avoir des effets pro-tumoraux autant que sa surexpression (Damodaran et al., 2017), c'est pourquoi il est primordial de prendre en compte le contexte dans lequel AurKA est inhibée ou surexprimée (type cellulaire, interphase, mitose) car les effets seront différents.

### **Autres effets d'ATIP3 en mitose**

#### ***Défaut dans le positionnement du fuseau mitotique***

Nos résultats ont montré qu'en plus d'une diminution de la taille du fuseau mitotique l'extinction d'ATIP3 provoque également un mauvais positionnement du fuseau, qui pourrait être complémentaire au phénotype observé sur la taille. La position du fuseau en métaphase est régulée essentiellement par les MTs astraux et des forces de tractions. Il serait intéressant d'étudier l'effet d'une déplétion d'ATIP3 sur la morphologie des MTs astraux (taille, densité). Une modification des MTs astraux par la perte d'ATIP3 pourrait expliquer le mauvais positionnement du fuseau dans la cellule.

Par ailleurs il est connu que Dda3 est impliquée dans la formation des MTs astraux et le positionnement du fuseau en interagissant avec Cep290 au niveau des centrosomes (Song et al., 2015). Il serait alors intéressant d'élucider si une déplétion ou une surexpression de Dda3 restaure les effets d'une perte d'ATIP3 sur le positionnement du fuseau. La même expérience avec des délétants de Dda3 incapables d'interagir avec ATIP3 nous permettrait de déterminer si le complexe ATIP3-Dda3-Kif2A est impliquée dans le mauvais positionnement du fuseau engendrée par la perte d'ATIP3.

EB1 est aussi connu pour stabiliser les MTs astraux après phosphorylation par la kinase ASK1 (Luo et al., 2016) et permet un bon positionnement du fuseau dans la cellule. Il serait intéressant d'étudier dans un premier temps si l'expression d'EB1-GFP restaure le phénotype de la déplétion d'ATIP3 sur la position du fuseau. Il faudrait alors ensuite déterminer si le domaine d'interaction avec EB1, CN, restaure un fuseau centré, ce qui indiquerait que l'interaction ATIP3-EB1 est impliquée dans ce phénotype. Et si les effets d'ATIP3 sur la position du fuseau implique une phosphorylation d'EB1, nous pourrions envisager qu'il s'agisse d'une phosphorylation par ASK1.

Récemment, une étude a montré que la dynéine, la dynactine et NuMA s'assemble au niveau du cortex de la cellule et déplace le fuseau mitotique en capturant les MTs astraux et en générant des forces de tractions (Okumura et al., 2018). L'implication de ces protéines dans les effets d'ATIP3 sur le positionnement du fuseau serait intéressant à explorer.

### ***Formation d'un fuseau mitotique multipolaire***

En plus d'induire une mauvaise position du fuseau mitotique et une réduction de sa taille, une déplétion d'ATIP3 engendre aussi des fuseaux multipolaires. La formation de ces fuseaux est dû à la présence de centrosomes surnuméraires acquis soit par une surduplication des centrosomes soit à partir d'une cytokinèse défectueuse lors de la division cellulaire précédente. En temps normal, une cellule présentant des centrosomes en excès est capable de les rassembler pour former un fuseau bipolaire fonctionnel et éviter les fuseaux multipolaires (Godinho et al., 2009; Quintyne et al., 2005).

AurKA est connue pour son rôle important dans la formation du fuseau bipolaire. Une perte d'activité d'AurKA (Asteriti et al., 2015; Barr and Gergely, 2007) ou une perte de ses substrats provoque des défauts dans la formation du fuseau (Walczak et al., 1998; Brittle and Ohkura, 2005). Récemment une étude a montré qu'une inhibition d'AurKA empêchait le rassemblement des centrosomes surnuméraires et provoquait ainsi des fuseaux multipolaires et désorganisés (Navarro-Serer et al., 2018). Une autre étude récente a montré que la protéine CPAP (Centrosomal P4.1-Associated Protein ou CENP-J), une protéine associée au centrosome, avait des similitudes avec ATIP3 concernant la formation de fuseaux multipolaires (Chou et al., 2016). CPAP interagit directement avec AurKA qui la phosphoryle en mitose. Une fois phosphorylée CPAP est présente au

centrosome avec les protéines du PCM et permet le maintien de l'intégrité du centrosome. Une déplétion de CPAP induit un retard dans le déroulement de la mitose, une dispersion du matériel péricentriolaire et des anomalies de mitoses incluant des fuseaux multipolaires. De plus, la dispersion du PCM est restauré par un mutant phosphomimétique de CPAP mais non par son mutant non phosphorylable, indiquant qu'une phosphorylation de CPAP par AurKA est nécessaire à l'intégrité du centrosome (Chou et al., 2016).

Dans notre étude il serait intéressant de déterminer si les effets d'une extinction d'ATIP3 sur la formation de fuseaux mitotiques multipolaires passe par l'activité d'AurKA. Pour cela une expérience de sauvetage dans des cellules déplétées en ATIP3 et transfectées avec GFP-AurKA et son mutant inactif serait à réaliser. Selon notre hypothèse, GFP-AurKA devrait restaurer les effets d'une déplétion d'ATIP3 et diminuer le nombre de fuseaux multipolaires contrairement à son mutant inactif GFP-AurA-KD.

De façon intéressante, PCM1 est un partenaire d'ATIP3 isolé par analyse protéomique. Une fois l'interaction ATIP3-PCM1 validée, il faudrait caractériser le complexe et étudier son éventuel rôle dans le maintien d'un fuseau bipolaire.

### ***Le devenir des cellules déficientes en ATIP3***

Une perte d'ATIP3 provoque des anomalies de mitose, il serait alors intéressant d'étudier les conséquences de ces anomalies et le devenir des cellules. Pour cela, des expériences de time-lapse sur des cellules HeLa-H2B (exprimant l'histone H2B-mCherry) déplétées ou non en protéine ATIP3 permettraient d'analyser si un défaut dans la taille ou dans la position du fuseau engendre des chromosomes isolés (« lagging chromosome »), mal attachés au fuseau. Ces vidéos permettraient également de déterminer si les cellules présentant des défauts de mitose ne peuvent plus se diviser et finissent par mourir par apoptose ou si au contraire elles persistent au cours des divisions cellulaires suivantes.

De façon intéressante, une analyse de l'aneuploïdie des cellules déficientes en ATIP3 répondrait à l'hypothèse selon laquelle les défauts de mitose engendrés par la déplétion d'ATIP3 mène à de l'aneuploïdie. Cette étude de l'aneuploïdie pourrait être réalisée par des expériences de FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), de CGH (Comparative In Situ Hybridization), de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou par établissement d'un caryotype.

### **Pertinence des résultats dans le cancer du sein**

#### ***Effets in vitro de la combinaison ATIP3-EB1***

L'expression combinée des protéines ATIP3 et EB1 a été évaluée dans le cancer du sein et a montré qu'elle pourrait améliorer le pronostic de la survie des patientes, et que de forts niveaux d'EB1 combinés à de faibles niveaux d'ATIP3 sont de plus mauvais pronostic.

Comment exploiter ces résultats dans une optique thérapeutique ?

Il serait intéressant d'établir des modèles à partir de cellules de cancer du sein par transfection stable avec des combinaisons de différents niveaux d'expression d'ATIP3 et d'EB1. Pour cela deux lignées de cancer du sein triple-négatifs pourraient être utilisées, les cellules HCC1143 exprimant ATIP3 et EB1 de façon endogène et les cellules MDA-MB-468 exprimant ATIP3 mais de faibles niveaux d'EB1. La déplétion d'ATIP3 et/ou d'EB1 par shRNA dans les cellules HCC1143, et la surexpression d'EB1 dans les cellules MDA-MB-468 permettront de déterminer si une déficience en ATIP3 associée à une surexpression d'EB1 a des effets délétères sur (i) la dynamique des microtubules, (ii) la polarité, la prolifération et la migration cellulaires, et (iii) la progression des tumeurs et des métastases in vivo.

Si c'est le cas, il serait intéressant par la suite de réintroduire ATIP3 ou un domaine actif d'ATIP3 dans ces cellules cancéreuses. Plusieurs stratégies (introduction de nanoparticules, de peptides, ou injection d'un ADN nu) peuvent être envisagées pour un traitement personnalisé (Bolhassani, 2011; Fioretti et al., 2014; Sanchez et al., 2014; Bu et al., 2015). Cependant, ATIP3 est une très grande protéine (1270 acides aminés), il est difficile de l'introduire dans les cellules cancéreuses. Par contre le domaine CN45 (45 acides aminés) semble être un bon candidat pour restaurer les effets d'une perte d'ATIP3 dans les cellules cancéreuses car il mime les fonctions de la protéine entière, telles que l'interaction avec EB1, la co-localisation avec les MTs, les effets sur la localisation d'EB1 au bout croissant des MTs et la polarité cellulaire. Des expériences supplémentaires devraient être réalisées afin de valider les effets du domaine CN45 sur les processus cellulaires, tels que la prolifération, la migration, la croissance tumorale et la formation de métastases pour déterminer si ce domaine est complètement fonctionnel. La conception et la modélisation de peptides basés sur la séquence de CN45 pourraient conduire au

développement d'importants outils thérapeutiques contre les tumeurs qui ont perdu ATIP3 et qui surexpriment EB1.

### ***Pertinence du complexe ATIP3-Kif2A-Dda3 dans le cancer du sein***

Notre étude a démontré qu'une déplétion d'ATIP3 augmentait les niveaux d'expression de Dda3. Cependant, les études réalisées sur Dda3 dans le cancer sont rares et ne permettent pas de conclure. De plus, aucune étude de Dda3 dans le cancer du sein n'a été établie. Cependant l'analyse de courbes de survie (Km Plotter) réalisée au laboratoire (données préliminaires) a démontré que de forts niveaux de Dda3 étaient associés à une survie globale et une survie sans rechute diminuées, ce qui suggère que Dda3 pourrait être un biomarqueur pronostique de la survie des patientes et nous pousse à étudier plus en détails la pertinence de Dda3 dans le cancer du sein et plus particulièrement dans les cancers ATIP3-négatifs.

Etant donné qu'il est plus facile de cibler la surexpression d'un biomarqueur, il serait intéressant de déterminer si l'augmentation de Dda3 dans des tumeurs du sein permet d'identifier les cancers déficients en ATIP3. Pour cela des expériences d'immunohistochimie sur des biopsies de patientes et des tissu-microarray de tumeurs du sein pourraient être réalisées avec les anticorps anti-ATIP3 et anti-Dda3, afin de valider si les tumeurs ATIP3-négatives présentent un niveau plus élevé de protéine Dda3. Si ce n'est pas le cas, il serait alors intéressant d'étudier la pertinence d'une combinaison des niveaux d'expression de ces deux protéines, comme pour ATIP3 et EB1, et si elle corrèle avec le grade des tumeurs et/ou la survie des patientes.

Sur la base de nos résultats montrant que la déplétion d'ATIP3 augmente le recrutement du complexe Kif2A/Dda3 au pôle, cibler Kif2A en induisant la dégradation de Dda3 ou en ciblant directement l'activité de Kif2A serait un bon outil thérapeutique contre les cancers du sein déficients en ATIP3. La mise en évidence d'un inhibiteur sélectif de Kif2A (le DHTP) (Talje et al., 2014), offre une voie d'entrée vers l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Au vu de nos résultats, la molécule DHTP devrait réverser le phénotype de l'extinction d'ATIP3 sur la taille du fuseau mitotique. Ses effets sur le devenir des cellules en mitose pourraient aussi être évalués par vidéomicroscopie. Si cette hypothèse se confirme, l'effet de la molécule DHTP sur la viabilité et la prolifération cellulaire, puis

sur la croissance tumorale *in vivo* serait à étudier. Ces travaux pourraient constituer la preuve de concept de l'efficacité d'un agent anti-Kif2A contre les cancers du sein ATIP3-déficients.

### Perspectives

L'analyse protéomique permettant d'identifier Kif2A comme partenaire d'interaction d'ATIP3 a permis d'identifier d'autres interactants d'ATIP3 qui seraient intéressants à étudier. Parmi eux, la protéine SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1) a été identifiée avec un score élevé. SKP1 est un composant essentiel des complexes SCF (SKP1-Cullin1-Fbox) qui représentent la plus grande famille des E3 ligases. Ces complexes dirigent l'ubiquitination des protéines conduisant à leur dégradation par le système ubiquitine protéasome et jouent donc un rôle primordial dans la majorité des processus cellulaires. Dans le complexe SCF, SKP1 sert d'adaptateur entre la Cullin1 et la F-box et c'est la protéine F-box qui détermine la spécificité des substrats ciblés par le complexe SCF.

Des résultats préliminaires d'immunoprécipitation ont validé qu'ATIP3 interagit avec la protéine SKP1 endogène. De plus, l'analyse de la séquence en acides aminés d'ATIP3 a révélé l'existence de 2 motifs F-box potentiels. Ces premiers résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle ATIP3 serait une nouvelle F-box, ce qu'il serait intéressant d'explorer.

L'étude réalisée sur la déficience d'ATIP3 en mitose s'est focalisée sur la métaphase, il serait alors intéressant d'aller étudier les conséquences d'une déplétion d'ATIP3 en anaphase et en cytokinèse, d'autant plus que, comme décrit dans l'introduction, Kif2A, Dda3 et AurKA jouent également des rôles importants lors de ces phases de la mitose. En particulier, Dda3 et AurKA sont impliquées dans la ségrégation des chromosomes (Jang et al., 2008; Kunitoku et al., 2003; Pascreau et al., 2003), Kif2A contrôle la longueur des microtubules inter-chromosomiques (Uehara et al., 2013) et AurKA est essentielle à l'assemblage du fuseau central lors de l'anaphase (Reboutier et al., 2015).

Enfin, ce travail pourrait être étendu à d'autres cancers, notamment les cancers dans lesquels l'expression du gène *MTUS1* est aussi fortement diminuée, incluant le cancer du pancréas (Seibold et al., 2003), de la vessie (Xiao et al., 2012; Rogler et al., 2014), de

l'ovaire (Pils et al., 2005), de la tête et cou (Ye et al., 2007; Ding et al., 2012; Zhao et al., 2015, Mahjabin & Kayani 2016), du colon (S. Lee et al., 2006; Zuern, 2009) et les carcinomes gastriques (Li et al., 2014).



# VI. Références

## VI. Références

- Adams, R.R., Carmena, M., Earnshaw, W.C., 2001. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 11, 49–54.
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 309–322. <https://doi.org/10.1038/nrm2369>
- Allemani, C., Weir, H.K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X.-S., Bannon, F., Ahn, J.V., Johnson, C.J., Bonaventure, A., Marcos-Gragera, R., Stiller, C., Azevedo e Silva, G., Chen, W.-Q., Ogunbiyi, O.J., Rachet, B., Soeberg, M.J., You, H., Matsuda, T., Bielska-Lasota, M., Storm, H., Tucker, T.C., Coleman, M.P., CONCORD Working Group, 2015. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet Lond. Engl.* 385, 977–1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9)
- Allen, C., Borisy, G.G., 1974. Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *J. Mol. Biol.* 90, 381–402.
- Almada, E., Tonucci, F.M., Hidalgo, F., Ferretti, A., Ibarra, S., Pariani, A., Vena, R., Favre, C., Girardini, J., Kierbel, A., Larocca, M.C., 2017. Akap350 Recruits Eb1 to The Spindle Poles, Ensuring Proper Spindle Orientation and Lumen Formation in 3d Epithelial Cell Cultures. *Sci. Rep.* 7, 14894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14241-y>
- Althuis, M.D., Dozier, J.M., Anderson, W.F., Devesa, S.S., Brinton, L.A., 2005. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int. J. Epidemiol.* 34, 405–412. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh414>
- Amano, M., Suzuki, A., Hori, T., Backer, C., Okawa, K., Cheeseman, I.M., Fukagawa, T., 2009. The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure. *J. Cell Biol.* 186, 173–182. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903100>
- Amos, L., Klug, A., 1974. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J. Cell Sci.* 14, 523–549.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., Venkitaraman, A.R., 2003. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3, 51–62.
- Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., Swedlow, J.R., 2004. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev. Cell* 6, 253–268.
- Arnerlöv, C., Emdin, S.O., Cajander, S., Bengtsson, N., Tavelin, B., Roos, G., 2001. Intratumoral Variations in DNA Ploidy and S-Phase Fraction in Human Breast Cancer. *Anal. Cell. Pathol.* 23, 21–28. <https://doi.org/10.1155/2001/430674>
- Asare, A., Levorse, J., Fuchs, E., 2017. Coupling organelle inheritance with mitosis to balance growth and differentiation. *Science* 355. <https://doi.org/10.1126/science.aah4701>
- Asteriti, I.A., De Mattia, F., Guarguaglini, G., 2015. Cross-Talk between AURKA and Plk1 in Mitotic Entry and Spindle Assembly. *Front. Oncol.* 5, 283. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00283>
- Asteriti, I.A., Giubettini, M., Lavia, P., Guarguaglini, G., 2011. Aurora-A inactivation causes mitotic spindle pole fragmentation by unbalancing microtubule-generated forces. *Mol. Cancer* 10, 131. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-131>
- Badache, A., Gonçalves, A., 2006. The ErbB2 Signaling Network as a Target for Breast Cancer Therapy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 11, 13–25. <https://doi.org/10.1007/s10911-006-9009-1>
- Bai, M., Ni, J., Wu, J., Wang, B., Shen, S., Yu, L., 2014. A novel mechanism for activation of Aurora-A kinase by Ajuba. *Gene* 543, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.048>
- Ban, R., Matsuzaki, H., Akashi, T., Sakashita, G., Taniguchi, H., Park, S.-Y., Tanaka, H., Furukawa, K., Urano, T., 2009. Mitotic Regulation of the Stability of Microtubule Plus-end Tracking Protein EB3 by Ubiquitin Ligase SIAH-1 and Aurora Mitotic Kinases. *J. Biol. Chem.* 284, 28367–28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000273>
- Bardou, V.-J., Arpino, G., Elledge, R.M., Osborne, C.K., Clark, G.M., 2003. Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone

- for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. *J. Clin. Oncol.* 21, 1973–1979. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.09.099>
- Barisic, M., Maiato, H., 2016. The Tubulin Code: A Navigation System for Chromosomes during Mitosis. *Trends Cell Biol.* 26, 766–775. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.06.001>
- Barok, M., Joensuu, H., Isola, J., 2014. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res.* 16. <https://doi.org/10.1186/bcr3621>
- Barr, A.R., Gergely, F., 2007. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J. Cell Sci.* 120, 2987–2996. <https://doi.org/10.1242/jcs.013136>
- Barros, T.P., Kinoshita, K., Hyman, A.A., Raff, J.W., 2005. Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *J. Cell Biol.* 170, 1039–1046. <https://doi.org/10.1083/jcb.200504097>
- Barton, V.N., D'Amato, N.C., Gordon, M.A., Christenson, J.L., Elias, A., Richer, J.K., 2015. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *Horm. Cancer* 6, 206–213. <https://doi.org/10.1007/s12672-015-0232-3>
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahnoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., Beck, J.T., Ito, Y., Yardley, D., Deleu, I., Perez, A., Bachelot, T., Vittori, L., Xu, Z., Mukhopadhyay, P., Lebwohl, D., Hortobagyi, G.N., 2012. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 520–529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109653>
- Baselga, J., Coleman, R.E., Cortés, J., Janni, W., 2017. Advances in the management of HER2-positive early breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 119, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.10.001>
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., Conti, E., 2003. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol. Cell* 12, 851–862.
- Berges, R., Baeza-Kallee, N., Tabouret, E., Chinot, O., Petit, M., Kruczynski, A., Figarella-Branger, D., Honore, S., Braguer, D., 2014. End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to *Vinca*-alkaloids *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* 5. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2646>
- Berges, R., Tchoghandjian, A., Honore, S., Esteve, M.-A., Figarella-Branger, D., Bachmann, F., Lane, H.A., Braguer, D., 2016. The Novel Tubulin-Binding Checkpoint Activator BAL101553 Inhibits EB1-Dependent Migration and Invasion and Promotes Differentiation of Glioblastoma Stem-like Cells. *Mol. Cancer Ther.* 15, 2740–2749. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0252>
- Bernard, M., Sanseau, P., Henry, C., Couturier, A., Prigent, C., 1998. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics* 53, 406–409. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5522>
- Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Rebutier, D., Prigent, C., Tramier, M., 2016. A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nat. Commun.* 7, 12674. <https://doi.org/10.1038/ncomms12674>
- Bertucci, F., Gonçalves, A., 2017. Immunotherapy in Breast Cancer: the Emerging Role of PD-1 and PD-L1. *Curr. Oncol. Rep.* 19. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0627-0>
- Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I.A., van Dijk, J., Janke, C., Surrey, T., 2008. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J. Cell Biol.* 183, 1223–1233. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809190>
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., Surrey, T., 2007. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature* 450, 1100–1105. <https://doi.org/10.1038/nature06386>
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J., Plowman, G.D., 1998. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17, 3052–3065. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3052>

- Bolanos-Garcia, V.M., 2005. Aurora kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1572–1577. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.021>
- Bolhassani, A., 2011. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.07.006>
- Bornens, M., 2008. Organelle positioning and cell polarity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 874–886. <https://doi.org/10.1038/nrm2524>
- Bosson, A., Soleilhac, J.-M., Valiron, O., Job, D., Andrieux, A., Moutin, M.-J., 2012. Cap-Gly proteins at microtubule plus ends: is EB1 detyrosination involved? *PLoS One* 7, e33490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033490>
- Bradbury, A.R., Olopade, O.I., 2007. Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 255–267. <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9038-0>
- Brinkley, W., 1997. Microtubules: a brief historical perspective. *J. Struct. Biol.* 118, 84–86.
- Brittle, A.L., Ohkura, H., 2005. Centrosome maturation: Aurora lights the way to the poles. *Curr. Biol.* 15, R880–882. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.022>
- Brufsky, A.M., Dickler, M.N., 2018. Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. *The Oncologist* 23, 528–539. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0423>
- Brust-Mascher, I., Sommi, P., Cheerambathur, D.K., Scholey, J.M., 2009. Kinesin-5-dependent Poleward Flux and Spindle Length Control in *Drosophila* Embryo Mitosis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1749–1762. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1033>
- Bu, W., Su, L.-K., 2003. Characterization of functional domains of human EB1 family proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 49721–49731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306194200>
- Bu, X., Zhu, T., Ma, Y., Shen, Q., 2015. Co-administration with cell penetrating peptide enhances the oral bioavailability of docetaxel-loaded nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 764–771. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.902465>
- Buey, R.M., Mohan, R., Leslie, K., Walzthoeni, T., Missimer, J.H., Menzel, A., Bjelic, S., Bargsten, K., Grigoriev, I., Smal, I., Meijering, E., Aebbersold, R., Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2011. Insights into EB1 structure and the role of its C-terminal domain for discriminating microtubule tips from the lattice. *Mol. Biol. Cell* 22, 2912–2923. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-01-0017>
- Buey, R.M., Sen, I., Kortt, O., Mohan, R., Gfeller, D., Veprintsev, D., Kretzschmar, I., Scheuermann, J., Neri, D., Zoete, V., Michielin, O., de Pereda, J.M., Akhmanova, A., Volkmer, R., Steinmetz, M.O., 2012. Sequence Determinants of a Microtubule Tip Localization Signal (MtLS). *J. Biol. Chem.* 287, 28227–28242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373928>
- Buster, D.W., Zhang, D., Sharp, D.J., 2007. Poleward tubulin flux in spindles: regulation and function in mitotic cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 3094–3104. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-0994>
- Cai, S., Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., 2009a. Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. *Mol. Biol. Cell* 20, 1348–1359. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0971>
- Cai, S., Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., 2009b. Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. *Mol. Biol. Cell* 20, 1348–1359. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0971>
- Cameron, L.A., Yang, G., Cimini, D., Canman, J.C., Kisurina-Evgenieva, O., Khodjakov, A., Danuser, G., Salmon, E.D., 2006. Kinesin 5-independent poleward flux of kinetochore microtubules in PtK1 cells. *J. Cell Biol.* 173, 173–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601075>
- Carmena, M., Pinson, X., Platani, M., Salloum, Z., Xu, Z., Clark, A., Macisaac, F., Ogawa, H., Eggert, U., Glover, D.M., Archambault, V., Earnshaw, W.C., 2012. The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol.* 10, e1001250. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001250>
- Carroll, J.S., 2016. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur. J. Endocrinol.* 175, R41–R49. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0124>

- Carter, B.D., Abnet, C.C., Feskanich, D., Freedman, N.D., Hartge, P., Lewis, C.E., Ockene, J.K., Prentice, R.L., Speizer, F.E., Thun, M.J., Jacobs, E.J., 2015. Smoking and mortality--beyond established causes. *N. Engl. J. Med.* 372, 631–640. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1407211>
- Casorzo, L., Dell'Aglio, C., Sarotto, I., Risio, M., 2015. Aurora kinase A gene copy number is associated with the malignant transformation of colorectal adenomas but not with the serrated neoplasia progression. *Hum. Pathol.* 46, 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.11.016>
- Cassimeris, L., Morabito, J., 2004. TOGp, the Human Homolog of XMAP215/Dis1, Is Required for Centrosome Integrity, Spindle Pole Organization, and Bipolar Spindle Assembly. *Mol. Biol. Cell* 15, 1580–1590. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0544>
- Chan, C.S., Botstein, D., 1993. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 135, 677–691.
- Chan, G.K., Liu, S.-T., Yen, T.J., 2005. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol.* 15, 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.010>
- Cheeseman, I.M., 2004. A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev.* 18, 2255–2268. <https://doi.org/10.1101/gad.1234104>
- Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J. seog, Yates, J.R., Chan, C.S.M., Drubin, D.G., Barnes, G., 2002. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* 111, 163–172.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., Desai, A., 2006. The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell* 127, 983–997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.039>
- Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., Desai, A., 2008. KNL1 and the CENP-H/I/K complex coordinately direct kinetochore assembly in vertebrates. *Mol. Biol. Cell* 19, 587–594. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-10-1051>
- Chen, C., Cummings, R., Mordovanakis, A., Hunt, A.J., Mayer, M., Sept, D., Yamashita, Y.M., 2018. Cytokine receptor-Eb1 interaction couples cell polarity and fate during asymmetric cell division. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.33685>
- Chen, J., Li, S., Zhou, S., Cao, S., Lou, Y., Shen, H., Yin, J., Li, G., 2017. Kinesin superfamily protein expression and its association with progression and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Ther.* 13, 651–659. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_491\\_17](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_491_17)
- Chen, J., Luo, Y., Li, L., Ran, J., Wang, X., Gao, S., Liu, M., Li, D., Shui, W., Zhou, J., 2014. Phosphoregulation of the dimerization and functions of end-binding protein 1. *Protein Cell* 5, 795–799. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0081-9>
- Chen, S.-S., Chang, P.-C., Cheng, Y.-W., Tang, F.-M., Lin, Y.-S., 2002. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J.* 21, 4491–4499.
- Chou, E.-J., Hung, L.-Y., Tang, C.-J.C., Hsu, W.-B., Wu, H.-Y., Liao, P.-C., Tang, T.K., 2016. Phosphorylation of CPAP by Aurora-A Maintains Spindle Pole Integrity during Mitosis. *Cell Rep.* 14, 2975–2987. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.085>
- Cimini, D., Moree, B., Canman, J.C., Salmon, E.D., 2003. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J. Cell Sci.* 116, 4213–4225. <https://doi.org/10.1242/jcs.00716>
- Cirak, Y., Furuncuoglu, Y., Yapicier, O., Aksu, A., Cubukcu, E., 2015. Aurora A overexpression in breast cancer patients induces taxane resistance and results in worse prognosis. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* 20, 1414–1419.
- Colditz, G.A., Bohlke, K., 2014. Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA. Cancer J. Clin.* 64, 186–194. <https://doi.org/10.3322/caac.21225>
- Colditz, G.A., Sellers, T.A., Trapido, E., 2006. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat. Rev. Cancer* 6, 75–83. <https://doi.org/10.1038/nrc1784>
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies

- in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet Lond. Engl.* 360, 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09454-0)
- Colleoni, M., Russo, L., Dellapasqua, S., 2011. Adjuvant therapies for special types of breast cancer. *Breast Edinb. Scotl.* 20 Suppl 3, S153-157. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(11\)70315-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(11)70315-0)
- Compton, D.A., 2011. Mechanisms of aneuploidy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.007>
- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J.P., Wolmark, N., Bonnefoi, H., Cameron, D., Gianni, L., Valagussa, P., Swain, S.M., Prowell, T., Loibl, S., Wickerham, D.L., Bogaerts, J., Baselga, J., Perou, C., Blumenthal, G., Blohmer, J., Mamounas, E.P., Bergh, J., Semiglazov, V., Justice, R., Eidtmann, H., Paik, S., Piccart, M., Sridhara, R., Fasching, P.A., Slaets, L., Tang, S., Gerber, B., Geyer, C.E., Pazdur, R., Ditsch, N., Rastogi, P., Eiermann, W., von Minckwitz, G., 2014. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* 384, 164–172. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62422-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62422-8)
- Cortes, J., Montero, A.J., Glück, S., 2012. Eribulin mesylate, a novel microtubule inhibitor in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 38, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.006>
- Courtheoux, T., Diallo, A., Damodaran, A.P., Rebutier, D., Watrin, E., Prigent, C., 2018. Aurora A kinase activity is required to maintain an active spindle assembly checkpoint during prometaphase. *J. Cell Sci.* 131, jcs191353. <https://doi.org/10.1242/jcs.191353>
- Damodaran, A.P., Vaufrey, L., Gavard, O., Prigent, C., 2017. Aurora A Kinase Is a Priority Pharmaceutical Target for the Treatment of Cancers. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.05.003>
- D’Assoro, A.B., Haddad, T., Galanis, E., 2016. Aurora-A Kinase as a Promising Therapeutic Target in Cancer. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00295>
- De Groot, C.O., Jelesarov, I., Damberger, F.F., Bjelić, S., Schärer, M.A., Bhavesh, N.S., Grigoriev, I., Buey, R.M., Wüthrich, K., Capitani, G., Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2010. Molecular Insights into Mammalian End-binding Protein Heterodimerization. *J. Biol. Chem.* 285, 5802–5814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068130>
- De Luca, M., Brunetto, L., Asteriti, I.A., Giubettini, M., Lavia, P., Guarguaglini, G., 2008. Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene* 27, 6539–6549. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.252>
- Dean-Colomb, W., Esteva, F.J., 2008. Her2-positive breast cancer: Herceptin and beyond. *Eur. J. Cancer* 44, 2806–2812. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.09.013>
- Decarreau, J., Wagenbach, M., Lynch, E., Halpern, A.R., Vaughan, J.C., Kollman, J., Wordeman, L., 2017. The tetrameric kinesin Kif25 suppresses pre-mitotic centrosome separation to establish proper spindle orientation. *Nat. Cell Biol.* 19, 384–390. <https://doi.org/10.1038/ncb3486>
- Desai, A., 2003. KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev.* 17, 2421–2435. <https://doi.org/10.1101/gad.1126303>
- Desai, A., Mitchison, T.J., 1997. MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83>
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., Walczak, C.E., 1999. Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. *Cell* 96, 69–78. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80960-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80960-5)
- Di Benedetto, M., Bièche, I., Deshayes, F., Vacher, S., Nouet, S., Collura, V., Seitz, I., Louis, S., Pineau, P., Amsellem-Ouazana, D., Couraud, P.O., Strosberg, A.D., Stoppa-Lyonnet, D., Lidereau, R., Nahmias, C., 2006a. Structural organization and expression of human MTUS1, a candidate 8p22 tumor suppressor gene encoding a family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins, ATIP. *Gene* 380, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.05.021>
- Di Benedetto, M., Pineau, P., Nouet, S., Berhouet, S., Seitz, I., Louis, S., Dejean, A., Couraud, P.O., Strosberg, A.D., Stoppa-Lyonnet, D., Nahmias, C., 2006b. Mutation analysis of the 8p22

- candidate tumor suppressor gene ATIP/MTUS1 in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.014>
- Ding, X., Zhang, N., Cai, Y., Li, S., Zheng, C., Jin, Y., Yu, T., Wang, A., Zhou, X., 2012. Down-regulation of tumor suppressor MTUS1/ATIP is associated with enhanced proliferation, poor differentiation and poor prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Mol. Oncol.* 6, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.11.002>
- Dixit, R., Barnett, B., Lazarus, J.E., Tokito, M., Goldman, Y.E., Holzbaur, E.L.F., 2009. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 492–497. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807614106>
- Do, T.-V., Xiao, F., Bickel, L.E., Klein-Szanto, A.J., Pathak, H.B., Hua, X., Howe, C., O'Brien, S.W., Maglaty, M., Ecsedy, J.A., Litwin, S., Golemis, E.A., Schilder, R.J., Godwin, A.K., Connolly, D.C., 2014. Aurora kinase A mediates epithelial ovarian cancer cell migration and adhesion. *Oncogene* 33, 539–549. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.632>
- Domnitz, S.B., Wagenbach, M., Decarreau, J., Wordeman, L., 2012. MCAK activity at microtubule tips regulates spindle microtubule length to promote robust kinetochore attachment. *J. Cell Biol.* 197, 231–237. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108147>
- Dong, X., Liu, F., Sun, L., Liu, M., Li, D., Su, D., Zhu, Z., Dong, J.-T., Fu, L., Zhou, J., 2009. Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J. Pathol.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/path.2662>
- Dragestein, K.A., van Cappellen, W.A., van Haren, J., Tsibidis, G.D., Akhmanova, A., Knoch, T.A., Grosveld, F., Galjart, N., 2008. Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 180, 729–737. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707203>
- Du, J., Jablonski, S., Yen, T.J., Hannon, G.J., 2008. Astrin regulates Aurora-A localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.072>
- Du Puy, L., Beqqali, A., Monshouwer-Kloots, J., Haagsman, H.P., Roelen, B.A.J., Passier, R., 2009. CAZIP, a novel protein expressed in the developing heart and nervous system. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 2903–2911. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22107>
- Dumont, J., Desai, A., 2012. Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends Cell Biol.* 22, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.007>
- Dumont, S., Mitchison, T.J., 2009. Force and Length in the Mitotic Spindle. *Curr. Biol.* 19, R749–R761. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.028>
- Dumontet, C., Jordan, M.A., 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 790–803. <https://doi.org/10.1038/nrd3253>
- Dutertre, S., Descamps, S., Prigent, C., 2002. On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 21, 6175–6183. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205775>
- Earnshaw, W.C., Rothfield, N., 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91, 313–321.
- Ellsworth, R.E., Blackburn, H.L., Shriver, C.D., Soon-Shiong, P., Ellsworth, D.L., 2017. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *Semin. Cell Dev. Biol.* 64, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.025>
- Endow, S.A., Chandra, R., Komma, D.J., Yamamoto, A.H., Salmon, E.D., 1994. Mutants of the *Drosophila ncd* microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *J. Cell Sci.* 107 ( Pt 4), 859–867.
- Espert, A., Uluocak, P., Bastos, R.N., Mangat, D., Graab, P., Gruneberg, U., 2014. PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* 206, 833–842. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406109>
- Eyers, P.A., Maller, J.L., 2004. Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2. *J. Biol. Chem.* 279, 9008–9015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312424200>
- Fant, X., Merdes, A., Haren, L., 2004. Cell and molecular biology of spindle poles and NuMA. *Int. Rev. Cytol.* 238, 1–57. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)38001-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)38001-0)
- Fenouille, N., Tichet, M., Dufies, M., Pottier, A., Mogha, A., Soo, J.K., Rocchi, S., Mallavialle, A., Galibert, M.-D., Khammari, A., Lacour, J.-P., Ballotti, R., Deckert, M., Tartare-Deckert, S., 2012. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a

- downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PloS One* 7, e40378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040378>
- Ferchichi, I., Kourda, N., Sassi, S., Romdhane, K.B., Balatgi, S., Cremet, J.Y., Prigent, C., Elgaaied, A.B., 2012. Aurora A overexpression and pVHL reduced expression are correlated with a bad kidney cancer prognosis. *Dis. Markers* 33, 333–340. <https://doi.org/10.3233/DMA-2012-00942>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ferreira, J.G., Pereira, A.J., Akhmanova, A., Maiato, H., 2013. Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. *J. Cell Biol.* 201, 709–724. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301131>
- Fidler, I.J., 1978. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 38, 2651–2660.
- Fidler, I.J., Kripke, M.L., 1977. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197, 893–895.
- Fioretti, D., Iurescia, S., Rinaldi, M., 2014. Recent advances in design of immunogenic and effective naked DNA vaccines against cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 9, 66–82.
- Frank, B., Bermejo, J.L., Hemminki, K., Sutter, C., Wappenschmidt, B., Meindl, A., Kiechle-Bahat, M., Bugert, P., Schmutzler, R.K., Bartram, C.R., Burwinkel, B., 2007. Copy number variant in the candidate tumor suppressor gene MTUS1 and familial breast cancer risk. *Carcinogenesis* 28, 1442–1445. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm033>
- Fry, A.M., Sampson, J., Shak, C., Shackleton, S., 2017. Recent advances in pericentriolar material organization: ordered layers and scaffolding gels. *F1000Research* 6, 1622. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11652.1>
- Fu, J., Bian, M., Xin, G., Deng, Z., Luo, J., Guo, X., Chen, H., Wang, Y., Jiang, Q., Zhang, C., 2015. TPX2 phosphorylation maintains metaphase spindle length by regulating microtubule flux. *J. Cell Biol.* 210, 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412109>
- Fujii, K., Kondo, T., Yokoo, H., Yamada, T., Iwatsuki, K., Hirohashi, S., 2005. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* 5, 1411–1422. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401004>
- Fujita, T., Mogi, M., Min, L.-J., Iwanami, J., Tsukuda, K., Sakata, A., Okayama, H., Iwai, M., Nahmias, C., Higaki, J., Horiuchi, M., 2009. Attenuation of cuff-induced neointimal formation by overexpression of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein 1. *Hypertens. Dallas Tex* 53, 688–693. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.128140>
- Fumoleau, P., Guiu, S., 2013. New Vinca Alkaloids in Clinical Development. *Curr. Breast Cancer Rep.* 5, 69–72. <https://doi.org/10.1007/s12609-012-0096-2>
- Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., Janke, C., 2017. The tubulin code at a glance. *J. Cell Sci.* 130, 1347–1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.199471>
- Gadde, S., Heald, R., 2004. Mechanisms and Molecules of the Mitotic Spindle. *Curr. Biol.* 14, R797–R805. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.021>
- Gaetz, J., Kapoor, T.M., 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* 166, 465–471. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404015>
- Gaglio, T., Dionne, M.A., Compton, D.A., 1997. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J. Cell Biol.* 138, 1055–1066.
- Gaglio, T., Saredi, A., Compton, D.A., 1995. NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *J. Cell Biol.* 131, 693–708.
- Galjart, N., 2010. Plus-End-Tracking Proteins and Their Interactions at Microtubule Ends. *Curr. Biol.* 20, R528–R537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.022>



- Ganem, N.J., Compton, D.A., 2004. The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J. Cell Biol.* 166, 473–478. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404012>
- Ganem, N.J., Godinho, S.A., Pellman, D., 2009. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278–282. <https://doi.org/10.1038/nature08136>
- Ganem, N.J., Upton, K., Compton, D.A., 2005. Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr. Biol. CB* 15, 1827–1832. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.065>
- Gao, S., Luo, Y., Wu, X., Li, Y., Zhou, Y., Lyu, R., Liu, M., Li, D., Zhou, J., 2017. EB1 phosphorylation mediates the functions of ASK1 in pancreatic cancer development. *Oncotarget* 8, 98233–98241. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21004>
- Garcia, M.A., Koonrugs, N., Toda, T., 2002. Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Curr. Biol. CB* 12, 610–621.
- Gassmann, R., Holland, A.J., Varma, D., Wan, X., Civril, F., Cleveland, D.W., Oegema, K., Salmon, E.D., Desai, A., 2010. Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes Dev.* 24, 957–971. <https://doi.org/10.1101/gad.1886810>
- Gemignani, M.L., Hetzel, D.J., 2017. Current advances in endocrine therapy options for premenopausal women with hormone receptor positive breast cancer. *Gynecol. Oncol.* 147, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.06.023>
- Ghosh, D.K., Dasgupta, D., Guha, A., 2012. Models, Regulations, and Functions of Microtubule Severing by Katanin. *ISRN Mol. Biol.* 2012, 596289. <https://doi.org/10.5402/2012/596289>
- Giet, R., Petretti, C., Prigent, C., 2005. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol.* 15, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.03.004>
- Gireesh, K.K., Shine, A., Lakshmi, R.B., Vijayan, V., Manna, T.K., 2018. GTP-binding facilitates EB1 recruitment onto microtubules by relieving its auto-inhibition. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28056-y>
- Godinho, S.A., Kwon, M., Pellman, D., 2009. Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 85–98. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9163-6>
- Godone, R.L.N., Leitão, G.M., Araújo, N.B., Castelletti, C.H.M., Lima-Filho, J.L., Martins, D.B.G., 2018. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. *Biomed. Pharmacother.* 106, 14–34. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.066>
- Goetz, M.P., Toi, M., Campone, M., Sohn, J., Paluch-Shimon, S., Huober, J., Park, I.H., Trédan, O., Chen, S.-C., Manso, L., Freedman, O.C., Garnica Jaliffe, G., Forrester, T., Frenzel, M., Barriga, S., Smith, I.C., Bourayou, N., Di Leo, A., 2017. MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 35, 3638–3646. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.6155>
- Goldstein, L.S., Philp, A.V., 1999. The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 141–183. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.141>
- Goodman, B., Channels, W., Qiu, M., Iglesias, P., Yang, G., Zheng, Y., 2010. Lamin B counteracts the kinesin Eg5 to restrain spindle pole separation during spindle assembly. *J. Biol. Chem.* 285, 35238–35244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.140749>
- Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N., Vale, R.D., 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J. Cell Biol.* 181, 421–429. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711053>
- Goshima, G., Nédélec, F., Vale, R.D., 2005a. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J. Cell Biol.* 171, 229–240. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505107>
- Goshima, G., Scholey, J.M., 2010. Control of Mitotic Spindle Length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 21–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104006>

- Goshima, G., Vale, R.D., 2003. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *J. Cell Biol.* 162, 1003–1016. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303022>
- Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S.S., Zhang, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., Stuurman, N., 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* 316, 417–421. <https://doi.org/10.1126/science.1141314>
- Goshima, G., Wollman, R., Stuurman, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., 2005b. Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* CB 15, 1979–1988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.054>
- Green, R.A., Wollman, R., Kaplan, K.B., 2005. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol. Biol. Cell* 16, 4609–4622. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0259>
- Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., 2008. STIM1 Is a MT-Plus-End-Tracking Protein Involved in Remodeling of the ER. *Curr. Biol.* 18, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.050>
- Grill, S.W., Hyman, A.A., 2005. Spindle Positioning by Cortical Pulling Forces. *Dev. Cell* 8, 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.014>
- Gucalp, A., Tolaney, S., Isakoff, S.J., Ingle, J.N., Liu, M.C., Carey, L.A., Blackwell, K., Rugo, H., Nabell, L., Forero, A., Stearns, V., Doane, A.S., Danso, M., Moynahan, M.E., Momen, L.F., Gonzalez, J.M., Akhtar, A., Giri, D.D., Patil, S., Feigin, K.N., Hudis, C.A., Traina, T.A., on behalf of the Translational Breast Cancer Research Consortium (TBCRC 011), 2013. Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor-Positive, Estrogen Receptor-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 5505–5512. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3327>
- Gucalp, A., Traina, T.A., 2016. Targeting the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Curr. Probl. Cancer* 40, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2016.09.004>
- Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., Hicks, D.G., Lester, S., Love, R., Mangu, P.B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C.K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F.C.G., Taube, S., Torlakovic, E.E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R.B., Wittliff, J.L., Wolff, A.C., 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 2784–2795. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6529>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., Oegema, K., 2001. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 155, 1109–1116. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108051>
- Harris, L.N., Ismaila, N., McShane, L.M., Andre, F., Collyar, D.E., Gonzalez-Angulo, A.M., Hammond, E.H., Kuderer, N.M., Liu, M.C., Mennel, R.G., Van Poznak, C., Bast, R.C., Hayes, D.F., 2016. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol.* 34, 1134–1150. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.2289>
- Hartkopf, A.D., Taran, F.-A., Wallwiener, M., Walter, C.B., Krämer, B., Grischke, E.-M., Brucker, S.Y., 2016. PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade to Treat Breast Cancer. *Breast Care* 11, 385–390. <https://doi.org/10.1159/000453569>
- Harvey, J.M., Clark, G.M., Osborne, C.K., Allred, D.C., 1999. Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 1474–1474. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.5.1474>

- Haugsten, E.M., Wiedlocha, A., Olsnes, S., Wesche, J., 2010. Roles of Fibroblast Growth Factor Receptors in Carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.* 8, 1439–1452. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0168>
- Hawkins, R.A., Killen, E., Tesdale, A.L., Sangster, K., Thomson, M., Steele, R.J., Blackie, R.A., 1988. Oestrogen receptors, lactate dehydrogenase and cellularity in human breast cancer. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 175, 89–96.
- Hayashi, I., Ikura, M., 2003. Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J. Biol. Chem.* 278, 36430–36434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305773200>
- Hirokawa, N., Noda, Y., Okada, Y., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 60–73.
- Hirokawa, N., Takemura, R., 2004. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp. Cell Res.* 301, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.010>
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., Saya, H., 2003. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585–598.
- Hoar, K., Chakravarty, A., Rabino, C., Wysong, D., Bowman, D., Roy, N., Ecsedy, J.A., 2007. MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4513–4525. <https://doi.org/10.1128/MCB.02364-06>
- Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y., Hirokawa, N., 2003. Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* 114, 229–239.
- Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K., Urano, T., 2000. Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 19, 2812–2819. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203609>
- Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F.J.A., Buey, R.M., Lawera, A., Jelesarov, I., Winkler, F.K., Wüthrich, K., Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2009. An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell* 138, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.065>
- Honnappa, S., Okhrimenko, O., Jaussi, R., Jawhari, H., Jelesarov, I., Winkler, F.K., Steinmetz, M.O., 2006. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol. Cell* 23, 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.07.013>
- Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C.B., Welburn, J.P., Dong, Y., McEwen, B.F., Shang, W.-H., Suzuki, E., Okawa, K., Cheeseman, I.M., Fukagawa, T., 2008. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* 135, 1039–1052. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.019>
- Hortobágyi, G.N., 1997. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 54 Suppl 4, 1–7.
- Howard, J., Hyman, A.A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753–758. <https://doi.org/10.1038/nature01600>
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., Salmon, E.D., 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* 155, 1159–1172. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105093>
- Hsieh, P.-C., Chang, J.-C., Sun, W.-T., Hsieh, S.-C., Wang, M.-C., Wang, F.-F., 2007. p53 downstream target DDA3 is a novel microtubule-associated protein that interacts with end-binding protein EB3 and activates beta-catenin pathway. *Oncogene* 26, 4928–4940. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210304>
- Hsieh, P.-C., Chiang, M.-L., Chang, J.-C., Yan, Y.-T., Wang, F.-F., Chou, Y.-C., 2012. DDA3 stabilizes microtubules and suppresses neurite formation. *J. Cell Sci.* 125, 3402–3411. <https://doi.org/10.1242/jcs.099150>

- Hsieh, S.-C., Lo, P.-K., Wang, F.-F., 2002. Mouse DDA3 gene is a direct transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 21, 3050–3057. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205417>
- Hsieh, W.-J., Hsieh, S.-C., Chen, C.-C., Wang, F.-F., 2008. Human DDA3 is an oncoprotein down-regulated by p53 and DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 567–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.047>
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M., Allis, C.D., 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279–291.
- Huang, X.-F., Luo, S.-K., Xu, J., Li, J., Xu, D.-R., Wang, L.-H., Yan, M., Wang, X.-R., Wan, X.-B., Zheng, F.-M., Zeng, Y.-X., Liu, Q., 2008. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 2854–2865. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099325>
- Huang, Y., Li, T., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., Prigent, C., Zhu, X., Zhang, X., Zheng, Y., 2018. Aurora A activation in mitosis promoted by BuGZ. *J. Cell Biol.* 217, 107–116. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706103>
- Hudis, C.A., 2007. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N. Engl. J. Med.* 357, 39–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>
- Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A., Knoblich, J.A., 2006. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev. Cell* 11, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.06.002>
- Hyman, A.A., Salser, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., Mitchison, T.J., 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell* 3, 1155–1167. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1155>
- Iimori, M., Ozaki, K., Chikashige, Y., Habu, T., Hiraoka, Y., Maki, T., Hayashi, I., Obuse, C., Matsumoto, T., 2012. A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules. *Exp. Cell Res.* 318, 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.11.006>
- Iimori, M., Watanabe, S., Kiyonari, S., Matsuoka, K., Sakasai, R., Saeki, H., Oki, E., Kitao, H., Maehara, Y., 2016. Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nat. Commun.* 7, 11117. <https://doi.org/10.1038/ncomms11117>
- Imen, F., Samia, S.H., Amal, B., Raja, M.T., Yves, C.J., Khaled, B.R., Claude, P., Amel, B.A.E.G., 2013. Assessment of Aurora A kinase expression in breast cancer: A tool for early diagnosis? *Dis. Markers* 63–69. <https://doi.org/10.3233/DMA-120947>
- Islami, F., Liu, Y., Jemal, A., Zhou, J., Weiderpass, E., Colditz, G., Boffetta, P., Weiss, M., 2015. Breastfeeding and breast cancer risk by receptor status—a systematic review and meta-analysis. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 2398–2407. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv379>
- Izawa, D., Pines, J., 2012. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 199, 27–37. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205170>
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., Fang, G., 2009. Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J. Cell Sci.* 122, 1334–1341. <https://doi.org/10.1242/jcs.044321>
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Yates, J.R., Fang, G., 2011. Mitotic kinases regulate MT-polymerizing/MT-bundling activity of DDA3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.004>
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Yates, J.R., Fang, G., 2010. Phospho-regulation of DDA3 function in mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.115>
- Jang, C.-Y., Fang, G., 2011. DDA3 associates with MCAK and controls chromosome congression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 610–614. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.081>

- Jang, C.-Y., Fang, G., 2009. The N-terminal domain of DDA3 regulates the spindle-association of the microtubule depolymerase Kif2a and controls the mitotic function of DDA3. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3165–3171. <https://doi.org/10.4161/cc.8.19.9724>
- Jang, C.-Y., Wong, J., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., Fang, G., 2008. DDA3 recruits microtubule depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement. *J. Cell Biol.* 181, 255–267. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711032>
- Janke, C., 2001. The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *EMBO J.* 20, 777–791. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.777>
- Jiang, K., Hua, S., Mohan, R., Grigoriev, I., Yau, K.W., Liu, Q., Katrukha, E.A., Altelaar, A.F.M., Heck, A.J.R., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., 2014. Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Dev. Cell* 28, 295–309. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.001>
- Jiang, K., Rezaczkova, L., Hua, S., Liu, Q., Capitani, G., Altelaar, A.F.M., Heck, A.J.R., Kammerer, R.A., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., 2017. Microtubule minus-end regulation at spindle poles by an ASPM-katanin complex. *Nat. Cell Biol.* 19, 480–492. <https://doi.org/10.1038/ncb3511>
- Jiang, K., Toedt, G., Montenegro Gouveia, S., Davey, N.E., Hua, S., van der Vaart, B., Grigoriev, I., Larsen, J., Pedersen, L.B., Bezstarosti, K., Lince-Faria, M., Demmers, J., Steinmetz, M.O., Gibson, T.J., Akhmanova, A., 2012. A Proteome-wide Screen for Mammalian SxIP Motif-Containing Microtubule Plus-End Tracking Proteins. *Curr. Biol.* 22, 1800–1807. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.047>
- Jiang, K., Wang, J., Liu, J., Ward, T., Wordeman, L., Davidson, A., Wang, F., Yao, X., 2009. TIP150 interacts with and targets MCAK at the microtubule plus ends. *EMBO Rep.* 10, 857–865. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.94>
- Jing, F., Mogi, M., Min, L.-J., Ohshima, K., Nakaoka, H., Tsukuda, K., Wang, X., Iwanami, J., Horiuchi, M., 2013. Effect of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein on adipose tissue function via modulation of macrophage polarization. *PloS One* 8, e60067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060067>
- Johnson, E.O., Chang, K.-H., Ghosh, S., Venkatesh, C., Giger, K., Low, P.S., Shah, K., 2012. LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. *J. Cell Sci.* 125, 1204–1216. <https://doi.org/10.1242/jcs.092304>
- Jordan, M.A., Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253–265. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>
- Jubin, T., Kadam, A., Jariwala, M., Bhatt, S., Sutariya, S., Gani, A.R., Gautam, S., Begum, R., 2016. The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. *Cell Prolif.* 49, 421–437. <https://doi.org/10.1111/cpr.12268>
- Kaklamani, V.G., Gradishar, W.J., 2017. Endocrine Therapy in the Current Management of Postmenopausal Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist* 22, 507–517. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0464>
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M., Sen, S., 2001. Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 276, 46219–46224. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107540200>
- Katsha, A., Belkhir, A., Goff, L., El-Rifai, W., 2015. Aurora kinase A in gastrointestinal cancers: time to target. *Mol. Cancer* 14, 106. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0375-4>
- Kettenbach, A.N., Gerber, S.A., 2011. Rapid and Reproducible Single-Stage Phosphopeptide Enrichment of Complex Peptide Mixtures: Application to General and Phosphotyrosine-Specific Phosphoproteomics Experiments. *Anal. Chem.* 83, 7635–7644. <https://doi.org/10.1021/ac201894j>
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., Rieder, C.L., 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr. Biol. CB* 10, 59–67.

- Khodjakov, A., Rieder, C.L., 2001. Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153, 237–242.
- Kim, A.J., Endow, S.A., 2000. A kinesin family tree. *J. Cell Sci.* 113 Pt 21, 3681–3682.
- Kim, Y.J., Choi, J.-S., Seo, J., Song, J.-Y., Eun Lee, S., Kwon, Mi Jung, Kwon, Mi Jeong, Kundu, J., Jung, K., Oh, E., Shin, Y.K., Choi, Y.-L., 2014. MET is a potential target for use in combination therapy with EGFR inhibition in triple-negative/basal-like breast cancer: MET/EGFR as potential targets in TNBC/BLBC. *Int. J. Cancer* 134, 2424–2436. <https://doi.org/10.1002/ijc.28566>
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K., Okano, Y., 1997. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.* 272, 13766–13771.
- Kinjo, T., Isomura, M., Iwamasa, T., Nakamura, Y., 2000. Molecular cloning and characterization of two novel genes on chromosome 8p21.3. *J. Hum. Genet.* 45, 12–17. <https://doi.org/10.1007/s100380050003>
- Kita, K., Wittmann, T., Näthke, I.S., Waterman-Storer, C.M., 2006. Adenomatous Polyposis Coli on Microtubule Plus Ends in Cell Extensions Can Promote Microtubule Net Growth with or without EB1. *Mol. Biol. Cell* 17, 2331–2345. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0498>
- Kline, S.L., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., Desai, A., 2006. The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 173, 9–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509158>
- Kline-Smith, S.L., Khodjakov, A., Hergert, P., Walczak, C.E., 2004. Depletion of Centromeric MCAK Leads to Chromosome Congression and Segregation Defects Due to Improper Kinetochore Attachments. *Mol. Biol. Cell* 15, 1146–1159. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0581>
- Knowlton, A.L., Lan, W., Stukenberg, P.T., 2006. Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr. Biol. CB* 16, 1705–1710. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.057>
- Knowlton, A.L., Vorozhko, V.V., Lan, W., Gorbsky, G.J., Stukenberg, P.T., 2009. ICIS and Aurora B coregulate the microtubule depolymerase Kif2a. *Curr. Biol. CB* 19, 758–763. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.018>
- Knudson, A.G., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823.
- Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., Fuchs, E., 2003. ACF7. *Cell* 115, 343–354. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00813-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00813-4)
- Komarova, Y., De Groot, C.O., Grigoriev, I., Gouveia, S.M., Munteanu, E.L., Schober, J.M., Honnappa, S., Buey, R.M., Hoogenraad, C.C., Dogterom, M., Borisy, G.G., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., 2009. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J. Cell Biol.* 184, 691–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807179>
- Kronja, I., Kruljac-Letic, A., Caudron-Herger, M., Bieling, P., Karsenti, E., 2009. XMAP215-EB1 interaction is required for proper spindle assembly and chromosome segregation in *Xenopus* egg extract. *Mol. Biol. Cell* 20, 2684–2696. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1051>
- Kufer, T.A., Nigg, E.A., Silljé, H.H.W., 2003. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. *Chromosoma* 112, 159–163. <https://doi.org/10.1007/s00412-003-0265-1>
- Kufer, T.A., Silljé, H.H.W., Körner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., Nigg, E.A., 2002. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* 158, 617–623. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204155>
- Kumar, P., Wittmann, T., 2012. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol.* 22, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.005>
- Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., Hirota, T., 2003. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell* 5, 853–864.
- Kwok, B.H., Kapoor, T.M., 2007. Microtubule flux: drivers wanted. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.12.003>

- Kwon, H.J., Park, J.E., Song, H., Jang, C.-Y., 2016. DDA3 and Mdp3 modulate Kif2a recruitment onto the mitotic spindle to control minus-end spindle dynamics. *J. Cell Sci.* 129, 2719–2725. <https://doi.org/10.1242/jcs.180109>
- Kwon, Y.-W., Kim, I.-J., Wu, D., Lu, J., Stock, W.A., Liu, Y., Huang, Y., Kang, H.C., DelRosario, R., Jen, K.-Y., Perez-Losada, J., Wei, G., Balmain, A., Mao, J.-H., 2012. Pten Regulates Aurora-A and Cooperates with Fbxw7 in Modulating Radiation-Induced Tumor Development. *Mol. Cancer Res.* 10, 834–844. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0025>
- Lam, S.W., Jimenez, C.R., Boven, E., 2014. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat. Rev.* 40, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.06.006>
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E., Stukenberg, P.T., 2004. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr. Biol. CB* 14, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.055>
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S.B., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S.N., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E., Wordeman, L., 2004. A standardized kinesin nomenclature: Table I. *J. Cell Biol.* 167, 19–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408113>
- Le Grand, M., Rovini, A., Bourgarel-Rey, V., Honore, S., Bastonero, S., Braguer, D., Carre, M., 2014. ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3 $\beta$ ; pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents. *Oncotarget* 5. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1982>
- Leal, S.M., Ott, J., 1995. Variability of genotype-specific penetrance probabilities in the calculation of risk support intervals. *Genet. Epidemiol.* 12, 859–862. <https://doi.org/10.1002/gepi.1370120655>
- Lee, C.-Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A., Doe, C.Q., 2006. Drosophila Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* 20, 3464–3474. <https://doi.org/10.1101/gad.1489406>
- Lee, E., Moon, A., 2016. Identification of Biomarkers for Breast Cancer Using Databases. *J. Cancer Prev.* 21, 235–242. <https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.4.235>
- Lee, J.J., Loh, K., Yap, Y.-S., 2015. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol. Med.* 12, 342–354. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0089>
- Lee, K., Rhee, K., 2011. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J. Cell Biol.* 195, 1093–1101. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106093>
- Lee, S., Bang, S., Song, K., Lee, I., 2006. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol. Rep.* <https://doi.org/10.3892/or.16.4.747>
- Leroy, C., Ramos, P., Cornille, K., Bonenfant, D., Fritsch, C., Voshol, H., Bentires-Alj, M., 2016. Activation of IGF1R/p110 $\beta$ /AKT/mTOR confers resistance to  $\alpha$ -specific PI3K inhibition. *Breast Cancer Res.* 18. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0697-1>
- Levesque, A.A., Howard, L., Gordon, M.B., Compton, D.A., 2003. A functional relationship between NuMA and kid is involved in both spindle organization and chromosome alignment in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 3541–3552. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0082>
- Li, J.J., Li, S.A., 2006. Mitotic kinases: The key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol. Ther.* 111, 974–984. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.02.006>
- Li, J.J., Papa, D., Davis, M.F., Weroha, S.J., Aldaz, C.M., El-Bayoumy, K., Ballenger, J., Tawfik, O., Li, S.A., 2002. Ploidy differences between hormone- and chemical carcinogen-induced rat mammary neoplasms: Comparison to invasive human ductal breast cancer. *Mol. Carcinog.* 33, 56–65. <https://doi.org/10.1002/mc.10022>

- Li, J.-M., Mogi, M., Tsukuda, K., Tomochika, H., Iwanami, J., Min, L.-J., Nahmias, C., Iwai, M., Horiuchi, M., 2007. Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol. Endocrinol.* Baltim. Md 21, 499–511. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0005>
- Li, M., Zhang, P., 2009. Spindle assembly checkpoint, aneuploidy and tumorigenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3440. <https://doi.org/10.4161/cc.8.21.9688>
- Li, Sijie, Han, B., Liu, G., Li, Songyun, Ouellet, J., Labrie, F., Pelletier, G., 2010. Immunocytochemical Localization of Sex Steroid Hormone Receptors in Normal Human Mammary Gland. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 509–515. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954644>
- Li, X., Liu, H., Yu, T., Dong, Z., Tang, L., Sun, X., 2014. Loss of MTUS1 in gastric cancer promotes tumor growth and metastasis. *Neoplasma* 61, 128–135. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2014\\_018](https://doi.org/10.4149/neo_2014_018)
- Ligon, L.A., Shelly, S.S., Tokito, M.K., Holzbaur, E.L.F., 2006. Microtubule binding proteins CLIP-170, EB1, and p150Glued form distinct plus-end complexes. *FEBS Lett.* 580, 1327–1332. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.050>
- Lindon, C., Pines, J., 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* 164, 233–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309035>
- Littlepage, L.E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J.K., Amundadottir, L.T., Ruderman, J.V., 2002. Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15440–15445. <https://doi.org/10.1073/pnas.202606599>
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Chen, J., Cheng, J.Q., 2004. Aurora-A Abrogation of p53 DNA Binding and Transactivation Activity by Phosphorylation of Serine 215. *J. Biol. Chem.* 279, 52175–52182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406802200>
- Liu, X., McLeod, I., Anderson, S., Yates, J.R., He, X., 2005. Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast. *EMBO J.* 24, 2919–2930. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600762>
- Lo Iacono, M., Monica, V., Saviozzi, S., Ceppi, P., Bracco, E., Papotti, M., Scagliotti, G.V., 2011. Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *J. Transl. Med.* 9, 100. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-100>
- Lo, P.-K., Chen, J.-Y., Lo, W.-C., Chen, B.-F., Hsin, J.-P., Tang, P.-P., Wang, F.-F., 1999. Identification of a novel mouse p53 target gene DDA3. *Oncogene* 18, 7765–7774. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203167>
- Lo, P.-K., Wang, F.-F., 2002. Cloning and characterization of human and mouse DDA3 genes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1579, 214–218. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00512-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00512-2)
- Loibl, S., Gianni, L., 2017. HER2-positive breast cancer. *The Lancet* 389, 2415–2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5)
- Lu, L.-Y., Wood, J.L., Ye, L., Minter-Dykhouse, K., Saunders, T.L., Yu, X., Chen, J., 2008. Aurora A Is Essential for Early Embryonic Development and Tumor Suppression. *J. Biol. Chem.* 283, 31785–31790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805880200>
- Lüders, J., Patel, U.K., Stearns, T., 2006. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 8, 137–147. <https://doi.org/10.1038/ncb1349>
- Luo, Y., Li, D., Ran, J., Yan, B., Chen, J., Dong, X., Liu, Z., Liu, R., Zhou, J., Liu, M., 2014. End-binding protein 1 stimulates paclitaxel sensitivity in breast cancer by promoting its actions toward microtubule assembly and stability. *Protein Cell* 5, 469–479. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0053-0>
- Luo, Y., Ran, J., Xie, S., Yang, Y., Chen, J., Li, S., Shui, W., Li, D., Liu, M., Zhou, J., 2016. ASK1 controls spindle orientation and positioning by phosphorylating EB1 and stabilizing astral microtubules. *Cell Discov.* 2. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.33>



- Lyle, K., Kumar, P., Wittmann, T., 2009a. SnapShot: Microtubule Regulators I. *Cell* 136, 380.e1-380.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.010>
- Lyle, K., Kumar, P., Wittmann, T., 2009b. SnapShot: Microtubule Regulators II. *Cell* 136, 566.e1-566.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.011>
- Macůrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., Medema, R.H., 2008. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119–123. <https://doi.org/10.1038/nature07185>
- Maffini, S., Maia, A.R.R., Manning, A.L., Maliga, Z., Pereira, A.L., Junqueira, M., Shevchenko, A., Hyman, A., Yates, J.R., Galjart, N., Compton, D.A., Maiato, H., 2009. Motor-independent targeting of CLASPs to kinetochores by CENP-E promotes microtubule turnover and poleward flux. *Curr. Biol. CB* 19, 1566–1572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.059>
- Maiato, H., Khodjakov, A., Rieder, C.L., 2005. Drosophila CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* 7, 42–47. <https://doi.org/10.1038/ncb1207>
- Maira, S.-M., Pecchi, S., Huang, A., Burger, M., Knapp, M., Sterker, D., Schnell, C., Guthy, D., Nagel, T., Wiesmann, M., Brachmann, S., Fritsch, C., Dorsch, M., Chene, P., Shoemaker, K., De Pover, A., Menezes, D., Martiny-Baron, G., Fabbro, D., Wilson, C.J., Schlegel, R., Hofmann, F., Garcia-Echeverria, C., Sellers, W.R., Voliva, C.F., 2012. Identification and Characterization of NVP-BKM120, an Orally Available Pan-Class I PI3-Kinase Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 11, 317–328. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0474>
- Maney, T., Hunter, A.W., Wagenbach, M., Wordeman, L., 1998. Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 142, 787–801.
- Manning, A.L., Compton, D.A., 2008. SnapShot: Nonmotor proteins in spindle assembly. *Cell* 134, 694. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.001>
- Manning, A.L., Compton, D.A., 2007. Mechanisms of Spindle-Pole Organization Are Influenced by Kinetochore Activity in Mammalian Cells. *Curr. Biol.* 17, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.071>
- Manning, A.L., Ganem, N.J., Bakhoun, S.F., Wagenbach, M., Wordeman, L., Compton, D.A., 2007. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 2970–2979. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0110>
- Margolis, R.L., Wilson, L., 1998. Microtubule treadmill: what goes around comes around. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 20, 830–836. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199810\)20:10<830::AID-BIES8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199810)20:10<830::AID-BIES8>3.0.CO;2-N)
- Margolis, R.L., Wilson, L., 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* 13, 1–8.
- Marthiens, V., Piel, M., Basto, R., 2012. Never tear us apart--the importance of centrosome clustering. *J. Cell Sci.* 125, 3281–3292. <https://doi.org/10.1242/jcs.094797>
- Maurer, S.P., Bieling, P., Cope, J., Hoenger, A., Surrey, T., 2011. GTP S microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3988–3993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014758108>
- Maurer, S.P., Cade, N.I., Bohner, G., Gustafsson, N., Boutant, E., Surrey, T., 2014. EB1 Accelerates Two Conformational Transitions Important for Microtubule Maturation and Dynamics. *Curr. Biol.* 24, 372–384. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.042>
- Maurer, S.P., Fourniol, F.J., Bohner, G., Moores, C.A., Surrey, T., 2012. EBs Recognize a Nucleotide-Dependent Structural Cap at Growing Microtubule Ends. *Cell* 149, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.049>
- Maxwell, C.A., Keats, J.J., Crainie, M., Sun, X., Yen, T., Shibuya, E., Hendzel, M., Chan, G., Pilarski, L.M., 2003. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol. Biol. Cell* 14, 2262–2276. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0377>
- Mayr, M.I., Hümmer, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G., Mayer, T.U., 2007. The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr. Biol. CB* 17, 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.036>

- McClelland, M.L., 2003. The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev.* 17, 101–114. <https://doi.org/10.1101/gad.1040903>
- McClelland, M.L., Gardner, R.D., Kallio, M.J., Daum, J.R., Gorbisky, G.J., Burke, D.J., Stukenberg, P.T., 2003. The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev.* 17, 101–114. <https://doi.org/10.1101/gad.1040903>
- McIntosh, J.R., O'Toole, E., Morgan, G., Austin, J., Ulyanov, E., Ataullakhanov, F., Gudimchuk, N., 2018. Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. *J. Cell Biol.* 217, 2691–2708. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802138>
- McNally, F.J., Okawa, K., Iwamatsu, A., Vale, R.D., 1996. Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes. *J. Cell Sci.* 109 ( Pt 3), 561–567.
- McNally, K., Audhya, A., Oegema, K., McNally, F.J., 2006. Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J. Cell Biol.* 175, 881–891. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608117>
- Meraldi, P., 2016. Centrosomes in spindle organization and chromosome segregation: a mechanistic view. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 24, 19–34. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9508-2>
- Merdes, A., Heald, R., Samejima, K., Earnshaw, W.C., Cleveland, D.W., 2000. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J. Cell Biol.* 149, 851–862.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., Hirokawa, N., 2001. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7004–7011. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145398>
- Miller, F.R., Miller, B.E., Heppner, G.H., 1983. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* 3, 22–31.
- Milošević, Z., Banković, J., Dinić, J., Tsimplouli, C., Sereti, E., Dragoj, M., Paunović, V., Milovanović, Z., Stepanović, M., Tanić, N., Dimas, K., Pešić, M., 2018. Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma. *Cell. Oncol.* <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0380-x>
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., Akhmanova, A., 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J. Cell Biol.* 168, 141–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405094>
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., Tsukita, S., 2000. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol. CB* 10, 865–868.
- Mimori-Kiyosue, Y., Tsukita, S., 2003. “Search-and-capture” of microtubules through plus-end-binding proteins (+TIPs). *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 321–326.
- Min, L.-J., Mogi, M., Iwanami, J., Jing, F., Tsukuda, K., Ohshima, K., Horiuchi, M., 2012. Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein prevents vascular senescence. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* 6, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2012.01.006>
- Mishima, M., Maesaki, R., Kasa, M., Watanabe, T., Fukata, M., Kaibuchi, K., Hakoshima, T., 2007. Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10346–10351. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703876104>
- Mitchison, T., Kirschner, M., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242. <https://doi.org/10.1038/312237a0>
- Mitchison, T.J., 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044–1047.
- Mitchison, T.J., 1989. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* 109, 637–652.
- Mitchison, T.J., Salmon, E.D., 1992. Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. *J. Cell Biol.* 119, 569–582.

- Miyamoto, D.T., Perlman, Z.E., Burbank, K.S., Groen, A.C., Mitchison, T.J., 2004. The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J. Cell Biol.* 167, 813–818. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407126>
- Mohan, R., Katrukha, E.A., Doodhi, H., Smal, I., Meijering, E., Kapitein, L.C., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., 2013. End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8900–8905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300395110>
- Moja, L., Brambilla, C., Compagnoni, A., Pistotti, V., 2006. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer, in: *The Cochrane Collaboration (Ed.), Cochrane Database of Systematic Reviews.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006243>
- Molina, A., Velot, L., Ghouinem, L., Abdelkarim, M., Bouchet, B.P., Luissint, A.-C., Bouhleb, I., Morel, M., Sapharikas, E., Di Tommaso, A., Honoré, S., Braguer, D., Gruel, N., Vincent-Salomon, A., Delattre, O., Sigal-Zafrani, B., André, F., Terris, B., Akhmanova, A., Di Benedetto, M., Nahmias, C., Rodrigues-Ferreira, S., 2013. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res.* 73, 2905–2915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3565>
- Morris, P.G., Hudis, C.A., 2009. Personalizing therapy for metastatic breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9, 1223–1226. <https://doi.org/10.1586/era.09.89>
- Morris, P.G., McArthur, H.L., Hudis, C.A., 2009. Therapeutic options for metastatic breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* 10, 967–981. <https://doi.org/10.1517/14656560902834961>
- Morrison, E.E., Wardleworth, B.N., Askham, J.M., Markham, A.F., Meredith, D.M., 1998. EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* 17, 3471–3477. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202247>
- Moustafa-Kamal, M., Gamache, I., Lu, Y., Li, S., Teodoro, J.G., 2013. BimEL is phosphorylated at mitosis by Aurora A and targeted for degradation by  $\beta$ TrCP1. *Cell Death Differ.* 20, 1393–1403. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.93>
- Musacchio, A., 2015. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol.* 25, R1002–R1018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.051>
- Musacchio, A., Desai, A., 2017. A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function. *Biology* 6. <https://doi.org/10.3390/biology6010005>
- Nadler, Y., Camp, R.L., Schwartz, C., Rimm, D.L., Kluger, H.M., Kluger, Y., 2008. Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 4455–4462. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5268>
- Nain, A.S., Cimini, D., 2013. MISPL: The missing link between extracellular matrix and astral microtubules. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1821–1822. <https://doi.org/10.4161/cc.25171>
- Nakagawa, H., Koyama, K., Murata, Y., Morito, M., Akiyama, T., Nakamura, Y., 2000. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene* 19, 210–216. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203308>
- Nasa, I., Kettenbach, A.N., 2018. Coordination of Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatase Activities in Mitosis. *Front. Cell Dev. Biol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00030>
- Navarro-Serer, B., Childers, E.P., Hermance, N.M., Mercadante, D., Manning, A.L., 2018. Aurora A inhibition limits centrosome clustering and promotes mitotic catastrophe in cells with supernumerary centrosomes. <https://doi.org/10.1101/401661>
- Nigg, E.A., 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints: Cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21–32. <https://doi.org/10.1038/35048096>
- Nigg, E.A., Stearns, T., 2011. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat. Cell Biol.* 13, 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/ncb2345>

- Nijenhuis, W., Vallardi, G., Teixeira, A., Kops, G.J.P.L., Saurin, A.T., 2014. Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Nat. Cell Biol.* 16, 1257–1264. <https://doi.org/10.1038/ncb3065>
- Nishigaki, R., Osaki, M., Hiratsuka, M., Toda, T., Murakami, K., Jeang, K.-T., Ito, H., Inoue, T., Oshimura, M., 2005. Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics* 5, 3205–3213. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401307>
- Noda, Y., 1995. KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J. Cell Biol.* 129, 157–167. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.157>
- Nogales, E., Wolf, S.G., Downing, K.H., 1998. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199–203. <https://doi.org/10.1038/34465>
- Noh, E.-M., Lee, Y.-R., Hong, O.-Y., Jung, S.H., Youn, H.J., Kim, J.-S., 2015. Aurora kinases are essential for PKC-induced invasion and matrix metalloproteinase-9 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 34, 803–810. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4027>
- Nouet, S., Amzallag, N., Li, J.-M., Louis, S., Seitz, I., Cui, T.-X., Alleaume, A.-M., Di Benedetto, M., Boden, C., Masson, M., Strosberg, A.D., Horiuchi, M., Couraud, P.-O., Nahmias, C., 2004. Trans-inactivation of Receptor Tyrosine Kinases by Novel Angiotensin II AT2 Receptor-interacting Protein, ATIP. *J. Biol. Chem.* 279, 28989–28997. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403880200>
- Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y., Yanagida, M., 2004. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat. Cell Biol.* 6, 1135–1141. <https://doi.org/10.1038/ncb1187>
- Ohi, R., Coughlin, M.L., Lane, W.S., Mitchison, T.J., 2003. An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin. *Dev. Cell* 5, 309–321.
- Ohi, R., Saprà, T., Howard, J., Mitchison, T.J., 2004. Differentiation of Cytoplasmic and Meiotic Spindle Assembly MCAK Functions by Aurora B-dependent Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 15, 2895–2906. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0082>
- Okumura, M., Natsume, T., Kanemaki, M.T., Kiyomitsu, T., 2018. Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36559>
- on behalf of the Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES), Ordóñez-Mena, J.M., Schöttker, B., Mons, U., Jenab, M., Freisling, H., Bueno-de-Mesquita, B., O'Doherty, M.G., Scott, A., Kee, F., Stricker, B.H., Hofman, A., de Keyser, C.E., Ruiter, R., Söderberg, S., Jousilahti, P., Kuulasmaa, K., Freedman, N.D., Wilsgaard, T., de Groot, L.C., Kampman, E., Håkansson, N., Orsini, N., Wolk, A., Nilsson, L.M., Tjønneland, A., Pająk, A., Malyutina, S., Kubínová, R., Tamosiunas, A., Bobak, M., Katsoulis, M., Orfanos, P., Boffetta, P., Trichopoulou, A., Brenner, H., 2016. Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0607-5>
- Orimo, T., Ojima, H., Hiraoka, N., Saito, S., Kosuge, T., Kakisaka, T., Yokoo, H., Nakanishi, K., Kamiyama, T., Todo, S., Hirohashi, S., Kondo, T., 2008. Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48, 1851–1863. <https://doi.org/10.1002/hep.22552>
- O'Rourke, B., Yang, C.-P.H., Sharp, D., Horwitz, S.B., 2014. Eribulin disrupts EB1-microtubule plus-tip complex formation. *Cell Cycle* 13, 3218–3221. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.950143>
- O'Shaughnessy, J., DeMichele, A., Ma, C.X., Richards, P., Yardley, D.A., Wright, G.S., Kalinsky, K., Steis, R., Diab, S., Kennealey, G., Geschwindt, R., Jiang, W., Rugo, H.S., 2018. A randomized, double-blind, phase 2 study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with advanced HER2-negative breast cancer and elevated C-reactive protein, a marker of systemic inflammation. *Breast Cancer Res. Treat.* 170, 547–557. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4770-6>

- Ottesen, G.L., Christensen, I.J., Larsen, J.K., Kerndrup, G.B., Hansen, B., Andersen, J.A., 1995. DNA aneuploidy in early breast cancer. *Br. J. Cancer* 72, 832–839.
- Pagano, A., Honoré, S., Mohan, R., Berges, R., Akhmanova, A., Braguer, D., 2012. Etoposide B inhibits migration of glioblastoma cells by inducing microtubule catastrophes and affecting EB1 accumulation at microtubule plus ends. *Biochem. Pharmacol.* 84, 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.010>
- Park, J.E., Song, H., Kwon, H.J., Jang, C.-Y., 2016. Ska1 cooperates with DDA3 for spindle dynamics and spindle attachment to kinetochores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.101>
- Pascreau, G., Arlot-Bonnemains, Y., Prigent, C., 2003. Phosphorylation of histone and histone-like proteins by aurora kinases during mitosis. *Prog. Cell Cycle Res.* 5, 369–374.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Aksten, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Peshkin, B.N., Alabek, M.L., Isaacs, C., 2011. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Dis.* 32, 25–33. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0306>
- Pfister, K., Pipka, J.L., Chiang, C., Liu, Y., Clark, R.A., Keller, R., Skoglund, P., Guertin, M.J., Hall, I.M., Stukenberg, P.T., 2018. Identification of Drivers of Aneuploidy in Breast Tumors. *Cell Rep.* 23, 2758–2769. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.102>
- Piehl, M., Cassimeris, L., 2003. Organization and Dynamics of Growing Microtubule Plus Ends during Early Mitosis. *Mol. Biol. Cell* 14, 916–925. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-09-0607>
- Pils, D., Horak, P., Gleiss, A., Sax, C., Fabjani, G., Moebus, V.J., Zielinski, C., Reinthaller, A., Zeillinger, R., Krainer, M., 2005. Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer* 104, 2417–2429. <https://doi.org/10.1002/cncr.21538>
- Pollard, T.D., Goldman, R.D., 2018. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a030288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030288>
- Portschy, P.R., Marmor, S., Nzara, R., Virnig, B.A., Tuttle, T.M., 2013. Trends in incidence and management of lobular carcinoma in situ: a population-based analysis. *Ann. Surg. Oncol.* 20, 3240–3246. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3121-4>
- Pourroy, B., Honoré, S., Pasquier, E., Bourgarel-Rey, V., Kruczynski, A., Briand, C., Braguer, D., 2006. Antiangiogenic Concentrations of Vinflunine Increase the Interphase Microtubule Dynamics and Decrease the Motility of Endothelial Cells. *Cancer Res.* 66, 3256–3263. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3885>
- Prigent, C., Gill, R., Trower, M., Sanseau, P., 1999. In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to Drosophila Aurora using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol.* 1, 123–128.
- Prosser, S.L., Pelletier, L., 2017. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 187–201. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162>
- Przewłoka, M.R., Zhang, W., Costa, P., Archambault, V., D'Avino, P.P., Lilley, K.S., Laue, E.D., McAinsh, A.D., Glover, D.M., 2007. Molecular Analysis of Core Kinetochores Composition and Assembly in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 2, e478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000478>
- Pugacheva, E.N., Golemis, E.A., 2005. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.* 7, 937–946. <https://doi.org/10.1038/ncb1309>
- Putkey, F.R., Cramer, T., Morphew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R., Cleveland, D.W., 2002. Unstable kinetochores-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev. Cell* 3, 351–365.
- Quintyne, N.J., Reing, J.E., Hoffelder, D.R., Gollin, S.M., Saunders, W.S., 2005. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 307, 127–129. <https://doi.org/10.1126/science.1104905>

- Raaijmakers, J.A., Tanenbaum, M.E., Medema, R.H., 2013. Systematic dissection of dynein regulators in mitosis. *J. Cell Biol.* 201, 201–215. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208098>
- Raemaekers, T., Ribbeck, K., Beaudouin, J., Annaert, W., Van Camp, M., Stockmans, I., Smets, N., Bouillon, R., Ellenberg, J., Carmeliet, G., 2003. NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J. Cell Biol.* 162, 1017–1029. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302129>
- Rakha, E.A., Lee, A.H.S., Evans, A.J., Menon, S., Assad, N.Y., Hodi, Z., Macmillan, D., Blamey, R.W., Ellis, I.O., 2010. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 99–104. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5051>
- Ran, J., Luo, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Chen, M., Liu, M., Li, D., Zhou, J., 2017. Phosphorylation of EB1 regulates the recruitment of CLIP-170 and p150<sup>glued</sup> to the plus ends of astral microtubules. *Oncotarget* 8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14222>
- Rath, U., Rogers, G.C., Tan, D., Gomez-Ferreria, M.A., Buster, D.W., Sosa, H.J., Sharp, D.J., 2009. The *Drosophila* kinesin-13, KLP59D, impacts Pacman- and Flux-based chromosome movement. *Mol. Biol. Cell* 20, 4696–4705. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0557>
- Reboutier, D., Benaud, C., Prigent, C., 2015. Aurora A's Functions During Mitotic Exit: The Guess Who Game. *Front. Oncol.* 5, 290. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00290>
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Chauvin, L., Guen, V., Salaun, P., Prigent, C., 2013. Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150<sup>Glued</sup>. *J. Cell Biol.* 201, 65–79. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210060>
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Fukasawa, K., Prigent, C., 2012. Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J. Cell Biol.* 197, 19–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.201107134>
- Reis, R., Feijão, T., Gouveia, S., Pereira, A.J., Matos, I., Sampaio, P., Maiato, H., Sunkel, C.E., 2009. Dynein and mast/orbit/CLASP have antagonistic roles in regulating kinetochore-microtubule plus-end dynamics. *J. Cell Sci.* 122, 2543–2553. <https://doi.org/10.1242/jcs.044818>
- Rice, L.M., 2018. A new look for the growing microtubule end? *J. Cell Biol.* 217, 2609–2611. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807036>
- Riehemann, K., Sorg, C., 1993. Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18, 82–83.
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., Conte, P., 2017. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *N. Engl. J. Med.* 377, 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>
- Rodionov, V.I., Borisy, G.G., 1997. Microtubule treadmill in vivo. *Science* 275, 215–218.
- Rodrigues-Ferreira, S., Di Tommaso, A., Dimitrov, A., Cazaubon, S., Gruel, N., Colasson, H., Nicolas, A., Chaverot, N., Molinié, V., Reyat, F., Sigal-Zafrani, B., Terris, B., Delattre, O., Radvanyi, F., Perez, F., Vincent-Salomon, A., Nahmias, C., 2009. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PloS One* 4, e7239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007239>
- Rodrigues-Ferreira, S., Nahmias, C., 2010. An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 684–690. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.009>
- Rogers, G.C., Rogers, S.L., Schwimmer, T.A., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., Vale, R.D., Scholey, J.M., Sharp, D.J., 2004. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* 427, 364–370. <https://doi.org/10.1038/nature02256>
- Rogers, G.C., Rogers, S.L., Sharp, D.J., 2005. Spindle microtubules in flux. *J. Cell Sci.* 118, 1105–1116. <https://doi.org/10.1242/jcs.02284>
- Rogers, S.L., Rogers, G.C., Sharp, D.J., Vale, R.D., 2002. *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 158, 873–884. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202032>

- Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Dorée, M., Philippe, M., Prigent, C., 1998. The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 5), 557–572.
- Rogler, A., Hoja, S., Giedl, J., Ekici, A.B., Wach, S., Taubert, H., Goebell, P.J., Wullich, B., Stöckle, M., Lehmann, J., Petsch, S., Hartmann, A., Stoehr, R., 2014. Loss of MTUS1/ATIP expression is associated with adverse outcome in advanced bladder carcinomas: data from a retrospective study. *BMC Cancer* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-214>
- Romé, P., Montembault, E., Franck, N., Pascal, A., Glover, D.M., Giet, R., 2010. Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J. Cell Biol.* 189, 651–659. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001144>
- Rong, R., Jiang, L.Y., Sheikh, M.S., Huang, Y., 2007. Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene* 26, 7700–7708. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210575>
- Rosen, P.P., Groshen, S., Kinne, D.W., Norton, L., 1993. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 11, 2090–2100. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.11.2090>
- Rovini, A., Gauthier, G., Bergès, R., Kruczynski, A., Braguer, D., Honoré, S., 2013. Anti-Migratory Effect of Vinflunine in Endothelial and Glioblastoma Cells Is Associated with Changes in EB1 C-Terminal Detyrosinated/Tyrosinated Status. *PLoS ONE* 8, e65694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065694>
- Roylance, R., Endesfelder, D., Jamal-Hanjani, M., Burrell, R.A., Gorman, P., Sander, J., Murphy, N., Birkbak, N.J., Hanby, A.M., Speirs, V., Johnston, S.R.D., Kschischo, M., Swanton, C., 2014. Expression of regulators of mitotic fidelity are associated with intercellular heterogeneity and chromosomal instability in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 148, 221–229. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3153-x>
- Rugo, H.S., Olopade, O.I., DeMichele, A., Yau, C., van 't Veer, L.J., Buxton, M.B., Hogarth, M., Hylton, N.M., Paoloni, M., Perlmutter, J., Symmans, W.F., Yee, D., Chien, A.J., Wallace, A.M., Kaplan, H.G., Boughey, J.C., Haddad, T.C., Albain, K.S., Liu, M.C., Isaacs, C., Khan, Q.J., Lang, J.E., Viscusi, R.K., Pusztai, L., Moulder, S.L., Chui, S.Y., Kemmer, K.A., Elias, A.D., Edmiston, K.K., Euhus, D.M., Haley, B.B., Nanda, R., Northfelt, D.W., Tripathy, D., Wood, W.C., Ewing, C., Schwab, R., Lyandres, J., Davis, S.E., Hirst, G.L., Sanil, A., Berry, D.A., Esserman, L.J., 2016. Adaptive Randomization of Veliparib–Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 23–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513749>
- Sabino, D., Brown, N.H., Basto, R., 2011. Drosophila Ajuba is not an Aurora-A activator but is required to maintain Aurora-A at the centrosome. *J. Cell Sci.* 124, 1156–1166. <https://doi.org/10.1242/jcs.076711>
- Salaycik, K.J., 2005. Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells. *J. Cell Sci.* 118, 4113–4122. <https://doi.org/10.1242/jcs.02531>
- Sanchez, C., El Hajj Diab, D., Connord, V., Clerc, P., Meunier, E., Pipy, B., Payré, B., Tan, R.P., Gougeon, M., Carrey, J., Gigoux, V., Fourmy, D., 2014. Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death. *ACS Nano* 8, 1350–1363. <https://doi.org/10.1021/nn404954s>
- Sasai, K., Katayama, H., Stenoien, D.L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E.A., Earnshaw, W.C., Brinkley, W.R., Sen, S., 2004. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 59, 249–263. <https://doi.org/10.1002/cm.20039>
- Sawin, K.E., Mitchison, T.J., 1994. Microtubule flux in mitosis is independent of chromosomes, centrosomes, and antiparallel microtubules. *Mol. Biol. Cell* 5, 217–226.
- Sawin, K.E., Mitchison, T.J., 1991. Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 941–954.

- Scarpace, S.L., 2012. Eribulin mesylate (E7389): review of efficacy and tolerability in breast, pancreatic, head and neck, and non-small cell lung cancer. *Clin. Ther.* 34, 1467–1473. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.06.003>
- Schmeichel, K.L., Weaver, V.M., Bissell, M.J., 1998. Structural cues from the tissue microenvironment are essential determinants of the human mammary epithelial cell phenotype. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3, 201–213.
- Schrøder, J.M., Schneider, L., Christensen, S.T., Pedersen, L.B., 2007. EB1 is required for primary cilia assembly in fibroblasts. *Curr. Biol. CB* 17, 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.055>
- Schroeder, R., Stevens, C., Sridhar, J., 2014. Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the Treatment of Aggressive Breast Cancer. *Molecules* 19, 15196–15212. <https://doi.org/10.3390/molecules190915196>
- Schukken, K.M., Foijer, F., 2018. CIN and Aneuploidy: Different Concepts, Different Consequences. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 40. <https://doi.org/10.1002/bies.201700147>
- Seibold, S., Rudroff, C., Weber, M., Galle, J., Wanner, C., Marx, M., 2003. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J.* 17, 1180–1182. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0934fje>
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.-Y., Yates, J.R., Fang, G., 2008. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 320, 1655–1658. <https://doi.org/10.1126/science.1157425>
- Sen, I., Veprintsev, D., Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2013. End Binding Proteins Are Obligatory Dimers. *PLoS ONE* 8, e74448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074448>
- Sengle, G., Tsutsui, K., Keene, D.R., Tufa, S.F., Carlson, E.J., Charbonneau, N.L., Ono, R.N., Sasaki, T., Wirtz, M.K., Samples, J.R., Fessler, L.I., Fessler, J.H., Sekiguchi, K., Hayflick, S.J., Sakai, L.Y., 2012. Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet.* 8, e1002425. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002425>
- Shirasu-Hiza, M., Perlman, Z.E., Wittmann, T., Karsenti, E., Mitchison, T.J., 2004. Eg5 causes elongation of meiotic spindles when flux-associated microtubule depolymerization is blocked. *Curr. Biol. CB* 14, 1941–1945. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.029>
- Siggelkow, W., Boehm, D., Gebhard, S., Battista, M., Sicking, I., Lebrecht, A., Solbach, C., Hellwig, B., Rahnenführer, J., Koelbl, H., Gehrman, M., Marchan, R., Cadenas, C., Hengstler, J.G., Schmidt, M., 2012. Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* 12, 562. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-562>
- Silk, A.D., Holland, A.J., Cleveland, D.W., 2009. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J. Cell Biol.* 184, 677–690. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810091>
- Silkworth, W.T., Nardi, I.K., Scholl, L.M., Cimini, D., 2009. Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PloS One* 4, e6564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006564>
- Solinas, C., Carbognin, L., De Silva, P., Criscitiello, C., Lambertini, M., 2017. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. *The Breast* 35, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.07.005>
- Song, H., Park, J.E., Jang, C.-Y., 2015. DDA3 targets Cep290 into the centrosome to regulate spindle positioning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.028>
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.-L., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lønning, P.E., Brown, P.O., Børresen-Dale, A.-L., Botstein, D., 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene



- expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8418–8423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
- Spiegelman, B.M., Penningroth, S.M., Kirschner, M.W., 1977. Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells. *Cell* 12, 587–600.
- Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., 2008. Capturing protein tails by CAP-Gly domains. *Trends Biochem. Sci.* 33, 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.08.006>
- Stenner, F., Liewen, H., Göttig, S., Henschler, R., Markuly, N., Kleber, S., Faust, M., Mischo, A., Bauer, S., Zweifel, M., Knuth, A., Renner, C., Wadle, A., 2013. RP1 Is a Phosphorylation Target of CK2 and Is Involved in Cell Adhesion. *PLoS ONE* 8, e67595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067595>
- Stenoien, D.L., Sen, S., Mancini, M.A., Brinkley, B.R., 2003. Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 134–146. <https://doi.org/10.1002/cm.10120>
- Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C.C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., van Cappellen, G., Akhmanova, A., Galjart, N., 2003. Visualization of Microtubule Growth in Cultured Neurons via the Use of EB3-GFP (End-Binding Protein 3-Green Fluorescent Protein). *J. Neurosci.* 23, 2655–2664. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02655.2003>
- Stypula-Cyrus, Y., Mutyal, N.N., Dela Cruz, M., Kunte, D.P., Radosevich, A.J., Wali, R., Roy, H.K., Backman, V., 2014. End-binding protein 1 (EB1) up-regulation is an early event in colorectal carcinogenesis. *FEBS Lett.* 588, 829–835. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.046>
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 55, 2972–2977.
- Su, L.-K., Qi, Y., 2001. Characterization of Human MAPRE Genes and Their Proteins. *Genomics* 71, 142–149. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6428>
- Summers, K., Kirschner, M.W., 1979. Characteristics of the polar assembly and disassembly of microtubules observed in vitro by darkfield light microscopy. *J. Cell Biol.* 83, 205–217.
- Sun, J., Knickelbein, K., He, K., Chen, D., Dudgeon, C., Shu, Y., Yu, J., Zhang, L., 2014. Aurora kinase inhibition induces PUMA via NF- $\kappa$ B to kill colon cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1298–1308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0846>
- Taguchi, S. ichi, Honda, K., Sugiura, K., Yamaguchi, A., Furukawa, K., Urano, T., 2002. Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett.* 519, 59–65.
- Talje, L., Ben El Kadhi, K., Atchia, K., Tremblay-Boudreault, T., Carreno, S., Kwok, B.H., 2014. DHTP is an allosteric inhibitor of the kinesin-13 family of microtubule depolymerases. *FEBS Lett.* 588, 2315–2320. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.024>
- Tamura, N., Simon, J.E., Nayak, A., Shenoy, R., Hiroi, N., Boilot, V., Funahashi, A., Draviam, V.M., 2015. A proteomic study of mitotic phase-specific interactors of EB1 reveals a role for SXIP-mediated protein interactions in anaphase onset. *Biol. Open* 4, 155–169. <https://doi.org/10.1242/bio.201410413>
- Tanenbaum, M.E., Macurek, L., van der Vaart, B., Galli, M., Akhmanova, A., Medema, R.H., 2011. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr. Biol. CB* 21, 1356–1365. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.017>
- Taylor, S.S., Scott, M.I.F., Holland, A.J., 2004. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 12, 599–616. <https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000036610.78380.51>
- Théry, M., Bornens, M., 2006. Cell shape and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 648–657. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.001>
- Thomas, G.E., Sreeja, J.S., Gireesh, K.K., Gupta, H., Manna, T.K., 2015. +TIP EB1 downregulates paclitaxel-induced proliferation inhibition and apoptosis in breast cancer cells through inhibition of paclitaxel binding on microtubules. *Int. J. Oncol.* 46, 133–146. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2701>

- Tillement, V., Remy, M.-H., Raynaud-Messina, B., Mazzolini, L., Haren, L., Merdes, A., 2009. Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus. *Biol. Cell* 101, 1–11. <https://doi.org/10.1042/BC20070162>
- Tirnauer, J.S., Bierer, B.E., 2000. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.* 149, 761–766.
- Tirnauer, J.S., Canman, J.C., Salmon, E.D., Mitchison, T.J., 2002a. EB1 Targets to Kinetochores with Attached, Polymerizing Microtubules. *Mol. Biol. Cell* 13, 4308–4316. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-04-0236>
- Tirnauer, J.S., Grego, S., Salmon, E.D., Mitchison, T.J., 2002b. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol. Biol. Cell* 13, 3614–3626. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-04-0210>
- Toughiri, R., Li, X., Du, Q., Bieberich, C.J., 2013. Phosphorylation of NuMA by Aurora-A kinase in PC-3 prostate cancer cells affects proliferation, survival, and interphase NuMA localization. *J. Cell. Biochem.* 114, 823–830. <https://doi.org/10.1002/jcb.24421>
- Toyoshima, F., Nishida, E., 2007. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J.* 26, 1487–1498. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601599>
- Tripathy, D., Bardia, A., Sellers, W.R., 2017. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 23, 3251–3262. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3157>
- Tsai, M.-Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., Zheng, Y., 2003. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 5, 242–248. <https://doi.org/10.1038/ncb936>
- Tsai, M.-Y., Zheng, Y., 2005. Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Curr. Biol. CB* 15, 2156–2163. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.054>
- Turashvili, G., Brogi, E., 2017. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front. Med.* 4, 227. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00227>
- Twu, N.-F., Yuan, C.-C., Yen, M.-S., Lai, C.-R., Chao, K.-C., Wang, P.-H., Wu, H.-H., Chen, Y.-J., 2009. Expression of Aurora kinase A and B in normal and malignant cervical tissue: high Aurora A kinase expression in squamous cervical cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 142, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.09.012>
- Uehara, R., Tsukada, Y., Kamasaki, T., Poser, I., Yoda, K., Gerlich, D.W., Goshima, G., 2013. Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase. *J. Cell Biol.* 202, 623–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302123>
- Uematsu, K., Okumura, F., Tonogai, S., Joo-Okumura, A., Alemayehu, D.H., Nishikimi, A., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., Kamura, T., 2016. ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. *J. Cell Biol.* 215, 95–106. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603062>
- Vader, G., Medema, R.H., Lens, S.M.A., 2006. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J. Cell Biol.* 173, 833–837. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604032>
- Vale, R.D., Reese, T.S., Sheetz, M.P., 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39–50.
- Valiron, O., Caudron, N., Job, D., 2001. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 2069–2084. <https://doi.org/10.1007/PL00000837>
- van Heesbeen, R.G.H.P., Tanenbaum, M.E., Medema, R.H., 2014. Balanced activity of three mitotic motors is required for bipolar spindle assembly and chromosome segregation. *Cell Rep.* 8, 948–956. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.015>
- Varella, L., Abraham, J., Kruse, M., 2017. Revisiting the Role of Bevacizumab in the Treatment of Breast Cancer. *Semin. Oncol.* 44, 273–285. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.10.010>

- Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S., Howard, J., 2009. Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell* 138, 1174–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.032>
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I.E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.-Y., Diéras, V., Guardino, E., Fang, L., Lu, M.W., Olsen, S., Blackwell, K., 2012. Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 367, 1783–1791. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209124>
- Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chrétien, D., Arnal, I., 2008. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat. Cell Biol.* 10, 415–421. <https://doi.org/10.1038/ncb1703>
- Vonderheide, R.H., Domchek, S.M., Clark, A.S., 2017. Immunotherapy for Breast Cancer: What Are We Missing? *Clin. Cancer Res.* 23, 2640–2646. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2569>
- Wade, R.H., 2009. On and around microtubules: an overview. *Mol. Biotechnol.* 43, 177–191. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9193-5>
- Walczak, C.E., Mitchison, T.J., Desai, A., 1996. XKCM1: A Xenopus Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly. *Cell* 84, 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80991-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80991-5)
- Walczak, C.E., Vernos, I., Mitchison, T.J., Karsenti, E., Heald, R., 1998. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr. Biol. CB* 8, 903–913.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., Lees, E., 2000. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 19, 4906–4916. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203847>
- Wan, X.-B., Long, Z.-J., Yan, M., Xu, J., Xia, L.-P., Liu, L., Zhao, Y., Huang, X.-F., Wang, X.-R., Zhu, X.-F., Hong, M.-H., Liu, Q., 2008. Inhibition of Aurora-A suppresses epithelial-mesenchymal transition and invasion by downregulating MAPK in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 29, 1930–1937. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn176>
- Wandke, C., Barisic, M., Sigl, R., Rauch, V., Wolf, F., Amaro, A.C., Tan, C.H., Pereira, A.J., Kutay, U., Maiato, H., Meraldi, P., Geley, S., 2012. Human chromokinesins promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* 198, 847–863. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110060>
- Wang, C.-Q., Qu, X., Zhang, X.-Y., Zhou, C.-J., Liu, G.-X., Dong, Z.-Q., Wei, F.-C., Sun, S.-Z., 2010. Overexpression of Kif2a promotes the progression and metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Oral Oncol.* 46, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.11.003>
- Wang, D., Zhu, H., Ye, Q., Wang, C., Xu, Y., 2016. Prognostic Value of KIF2A and HER2-Neu Overexpression in Patients With Epithelial Ovarian Cancer. *Medicine (Baltimore)* 95, e2803. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002803>
- Wang, J., Ma, S., Ma, R., Qu, X., Liu, W., Lv, C., Zhao, S., Gong, Y., 2014. KIF2A silencing inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells and correlates with unfavorable prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* 14, 461. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-461>
- Wang, K., Lin, C., Wang, C., Shao, Q., Gao, W., Song, B., Wang, L., Song, X., Qu, X., Wei, F., 2014. Silencing Kif2a induces apoptosis in squamous cell carcinoma of the oral tongue through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 9, 273–278. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1804>
- Wang, L.-H., Yan, M., Xu, D.-Z., Cao, J.-X., Zhu, X.-F., Zeng, Y.-X., Liu, Q., 2008. Requirement of aurora-A kinase in astral microtubule polymerization and spindle microtubule flux. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 1104–1111. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5738>
- Wang, X., Lu, N., Niu, B., Chen, X., Xie, J., Cheng, N., 2012. Overexpression of Aurora-A enhances invasion and matrix metalloproteinase-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 588–596. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0416>

- Wang, Y., Zhou, X., Zhu, H., Liu, S., Zhou, C., Zhang, G., Xue, L., Lu, N., Quan, L., Bai, J., Zhan, Q., Xu, N., 2005. Overexpression of EB1 in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) may promote cellular growth by activating beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 24, 6637–6645. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208819>
- Ward, T., Wang, M., Liu, X., Wang, Z., Xia, P., Chu, Y., Wang, X., Liu, L., Jiang, K., Yu, H., Yan, M., Wang, J., Hill, D.L., Huang, Y., Zhu, T., Yao, X., 2013. Regulation of a Dynamic Interaction between Two Microtubule-binding Proteins, EB1 and TIP150, by the Mitotic p300/CBP-associated Factor (PCAF) Orchestrates Kinetochores Microtubule Plasticity and Chromosome Stability during Mitosis. *J. Biol. Chem.* 288, 15771–15785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448886>
- Waterman-Storer, C.M., Desai, A., Bulinski, J.C., Salmon, E.D., 1998. Fluorescent speckle microscopy, a method to visualize the dynamics of protein assemblies in living cells. *Curr. Biol.* CB 8, 1227–1230.
- Waterman-Storer, C.M., Salmon, E.D., 1997. Microtubule dynamics: treadmill comes around again. *Curr. Biol.* CB 7, R369–372.
- Waters, J.C., Mitchison, T.J., Rieder, C.L., Salmon, E.D., 1996. The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work. *Mol. Biol. Cell* 7, 1547–1558.
- Weaver, B.A., Cleveland, D.W., 2006. Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 658–667. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.002>
- Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., Stout, J.R., LeBlanc, C., Shaw, S.L., Gardner, M.K., Walczak, C.E., 2011. Kif18A uses a microtubule binding site in the tail for plus-end localization and spindle length regulation. *Curr. Biol.* CB 21, 1500–1506. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.005>
- Wei, R.R., Sorger, P.K., Harrison, S.C., 2005. Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5363–5367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501168102>
- Weisenberg, R.C., 1972. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177, 1104–1105.
- Welburn, J.P.I., Cheeseman, I.M., 2012. The microtubule-binding protein Cep170 promotes the targeting of the kinesin-13 depolymerase Kif2b to the mitotic spindle. *Mol. Biol. Cell* 23, 4786–4795. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-03-0214>
- Welburn, J.P.I., Jeyaprakash, A.A., 2018. Mechanisms of Mitotic Kinase Regulation: A Structural Perspective. *Front. Cell Dev. Biol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00006>
- West, R.R., Malmstrom, T., McIntosh, J.R., 2002. Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *J. Cell Sci.* 115, 931–940.
- Wiesener, Hauser-Kronberger, Zipperer, Dietze, Menzel, C., Hacker, 1998. p34cdc2 in invasive breast cancer: relationship to DNA content, Ki67 index and c-erbB-2 expression. *Histopathology* 33, 522–530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1998.00500.x>
- Wigge, P.A., Kilmartin, J.V., 2001. The Ndc80p Complex from *Saccharomyces cerevisiae* Contains Conserved Centromere Components and Has a Function in Chromosome Segregation. *J. Cell Biol.* 152, 349–360. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.2.349>
- Wilkins, B.J., Rall, N.A., Ostwal, Y., Kruitwagen, T., Hiragami-Hamada, K., Winkler, M., Barral, Y., Fischle, W., Neumann, H., 2014. A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis. *Science* 343, 77–80. <https://doi.org/10.1126/science.1244508>
- Wittmann, T., Hyman, A., Desai, A., 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3, E28–34. <https://doi.org/10.1038/35050669>
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R.B., Mangu, P.B., Paik, S., Perez, E.A., Press, M.F., Spears, P.A., Vance, G.H., Viale, G., Hayes, D.F., 2013. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* 31, 3997–4013. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984>

- Woodruff, J.B., Wueseke, O., Hyman, A.A., 2014. Pericentriolar material structure and dynamics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0459>
- Wordeman, L., 2005. Microtubule-depolymerizing kinesins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.12.003>
- Wordeman, L., Mitchison, T.J., 1995. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* 128, 95–104.
- Wruck, C.J., Funke-Kaiser, H., Pufe, T., Kusserow, H., Menk, M., Scheffe, J.H., Kruse, M.L., Stoll, M., Unger, T., 2005. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 57–64. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150662.51436.14>
- Wu, X., Xiang, X., Hammer, J.A., 2006. Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol.* 16, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.01.004>
- Wu, X.S., Tsan, G.L., Hammer, J.A., 2005. Melanophilin and myosin Va track the microtubule plus end on EB1. *J. Cell Biol.* 171, 201–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503028>
- Xia, P., Wang, Z., Liu, X., Wu, B., Wang, J., Ward, T., Zhang, L., Ding, X., Gibbons, G., Shi, Y., Yao, X., 2012. EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16564–16569. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202639109>
- Xiao, J., Chen, J.-X., Zhu, Y.-P., Zhou, L.-Y., Shu, Q.-A., Chen, L.-W., 2012. Reduced expression of MTUS1 mRNA is correlated with poor prognosis in bladder cancer. *Oncol. Lett.* 4, 113–118. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.673>
- Xie, T., Li, X., Ye, F., Lu, C., Huang, H., Wang, F., Cao, X., Zhong, C., 2018. High KIF2A expression promotes proliferation, migration and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.020>
- Xu, Y.Z., Cao, X.M., Ye, Q., Zhang, S., Zhang, Y.Q., Shen, Z.J., 2017. [The expression and significance of microtubule - driven protein KIF2A in epithelial ovarian cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 97, 3320–3323.
- Yamamoto, Y., Ibusuki, M., Nakano, M., Kawasoe, T., Hiki, R., Iwase, H., 2009. Clinical significance of basal-like subtype in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 16, 260–267. <https://doi.org/10.1007/s12282-009-0150-8>
- Yang, C., Wu, J., de Heus, C., Grigoriev, I., Liv, N., Yao, Y., Smal, I., Meijering, E., Klumperman, J., Qi, R.Z., Akhmanova, A., 2017. EB1 and EB3 regulate microtubule minus end organization and Golgi morphology. *J. Cell Biol.* 216, 3179–3198. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701024>
- Yang, J., Ikezoe, T., Nishioka, C., Nobumoto, A., Udaka, K., Yokoyama, A., 2013. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. *Int. J. Cancer* 133, 2706–2719. <https://doi.org/10.1002/ijc.28277>
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K.F., Cleveland, D.W., 2000. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2, 484–491. <https://doi.org/10.1038/35019518>
- Ye, H., Pungpravat, N., Huang, B.-L., Muzio, L.L., Marigliò, M.A., Chen, Z., Wong, D.T., Zhou, X., 2007. Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21.3~p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 176, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2007.04.003>
- Young, R.H., Louis, D.N., 2011. The Warrens and other pioneering clinician pathologists of the Massachusetts General Hospital during its early years: an appreciation on the 200th anniversary of the hospital founding. *Mod. Pathol.* 24, 1285–1294. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.132>
- Yu, J., Liu, X., Ye, H., Zhou, X., 2009. Genomic characterization of the human mitochondrial tumor suppressor gene 1 (MTUS1): 5' cloning and preliminary analysis of the multiple gene promoters. *BMC Res. Notes* 2, 109. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-109>

- Zanic, M., Stear, J.H., Hyman, A.A., Howard, J., 2009. EB1 Recognizes the Nucleotide State of Tubulin in the Microtubule Lattice. *PLoS ONE* 4, e7585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007585>
- Zeng, K., Bastos, R.N., Barr, F.A., Gruneberg, U., 2010. Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J. Cell Biol.* 191, 1315–1332. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008106>
- Zhai, Y., Kronebusch, P.J., Borisy, G.G., 1995. Kinetochore microtubule dynamics and the metaphase-anaphase transition. *J. Cell Biol.* 131, 721–734.
- Zhang, D., Rogers, G.C., Buster, D.W., Sharp, D.J., 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the “Pacman-flux” machinery that moves chromosomes. *J. Cell Biol.* 177, 231–242. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612011>
- Zhang, L., Shao, H., Zhu, T., Xia, P., Wang, Z., Liu, L., Yan, M., Hill, D.L., Fang, G., Chen, Z., Wang, D., Yao, X., 2013. DDA3 associates with microtubule plus ends and orchestrates microtubule dynamics and directional cell migration. *Sci. Rep.* 3, 1681. <https://doi.org/10.1038/srep01681>
- Zhang, R., Alushin, G.M., Brown, A., Nogales, E., 2015. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* 162, 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.012>
- Zhang, S., Huang, F., Wang, Y., Song, Q., Yang, X., Wu, H., 2016. KIF2A Overexpression and Its Association with Clinicopathologic Characteristics and Poor Prognoses in Patients with Gastric Cancer. *Dis. Markers* 2016, 7484516. <https://doi.org/10.1155/2016/7484516>
- Zhang, X., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., 2008. Aurora A phosphorylates MCAK to control random spindle bipolarity. *Mol. Biol. Cell* 19, 2752–2765. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-02-0198>
- Zhang, X., Ma, C., Wang, Q., Liu, J., Tian, M., Yuan, Y., Li, X., Qu, X., 2016. Role of KIF2A in the progression and metastasis of human glioma. *Mol. Med. Rep.* 13, 1781–1787. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4700>
- Zhang, Y., Luo, Y., Lyu, R., Chen, J., Liu, R., Li, D., Liu, M., Zhou, J., 2016. Proto-Oncogenic Src Phosphorylates EB1 to Regulate the Microtubule-Focal Adhesion Crosstalk and Stimulate Cell Migration. *Theranostics* 6, 2129–2140. <https://doi.org/10.7150/thno.16356>
- Zhang, Y., You, X., Liu, H., Xu, M., Dang, Q., Yang, L., Huang, J., Shi, W., 2017. High KIF2A expression predicts unfavorable prognosis in diffuse large B cell lymphoma. *Ann. Hematol.* 96, 1485–1491. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3047-1>
- Zhao, P., Lan, F., Zhang, H., Zeng, G., Liu, D., 2018. Down-regulation of KIF2A inhibits gastric cancer cell invasion via suppressing MT1-MMP. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12974>
- Zhao, T., Ding, X., Chang, B., Zhou, X., Wang, A., 2015. MTUS1/ATIP3a down-regulation is associated with enhanced migration, invasion and poor prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma. *BMC Cancer* 15, 203. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1209-x>
- Zhao, T., He, Q., Liu, Z., Ding, X., Zhou, X., Wang, A., 2016. Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein 3a suppresses proliferation, migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma via the extracellular signal-regulated kinase-Snai2 pathway. *Oncol. Lett.* 11, 340–344. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3898>
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., Sen, S., 1998. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* 20, 189–193. <https://doi.org/10.1038/2496>
- Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J.D., Bossy-Wetzell, E., Fan, J.-B., Abraham, R.T., Jiang, W., 2005. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol. Biol. Cell* 16, 3187–3199. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-02-0167>
- Zimniak, T., Stengl, K., Mechtler, K., Westermann, S., 2009. Phosphoregulation of the budding yeast EB1 homologue Bim1p by Aurora/Ipl1p. *J. Cell Biol.* 186, 379–391. <https://doi.org/10.1083/jcb.200901036>

- Zorba, A., Buosi, V., Kutter, S., Kern, N., Pontiggia, F., Cho, Y.-J., Kern, D., 2014. Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2. *eLife* 3, e02667.
- Zou, Z., Yuan, Z., Zhang, Q., Long, Z., Chen, J., Tang, Z., Zhu, Y., Chen, S., Xu, J., Yan, M., Wang, J., Liu, Q., 2012. Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells. *Autophagy* 8, 1798–1810. <https://doi.org/10.4161/auto.22110>
- Zuern, 2009. Down-regulation of MTUS1 in human colon tumors. *Oncol. Rep.* 23. [https://doi.org/10.3892/or\\_00000621](https://doi.org/10.3892/or_00000621)

# VII. Annexes





## VII. Annexes

### ARTICLE 5:

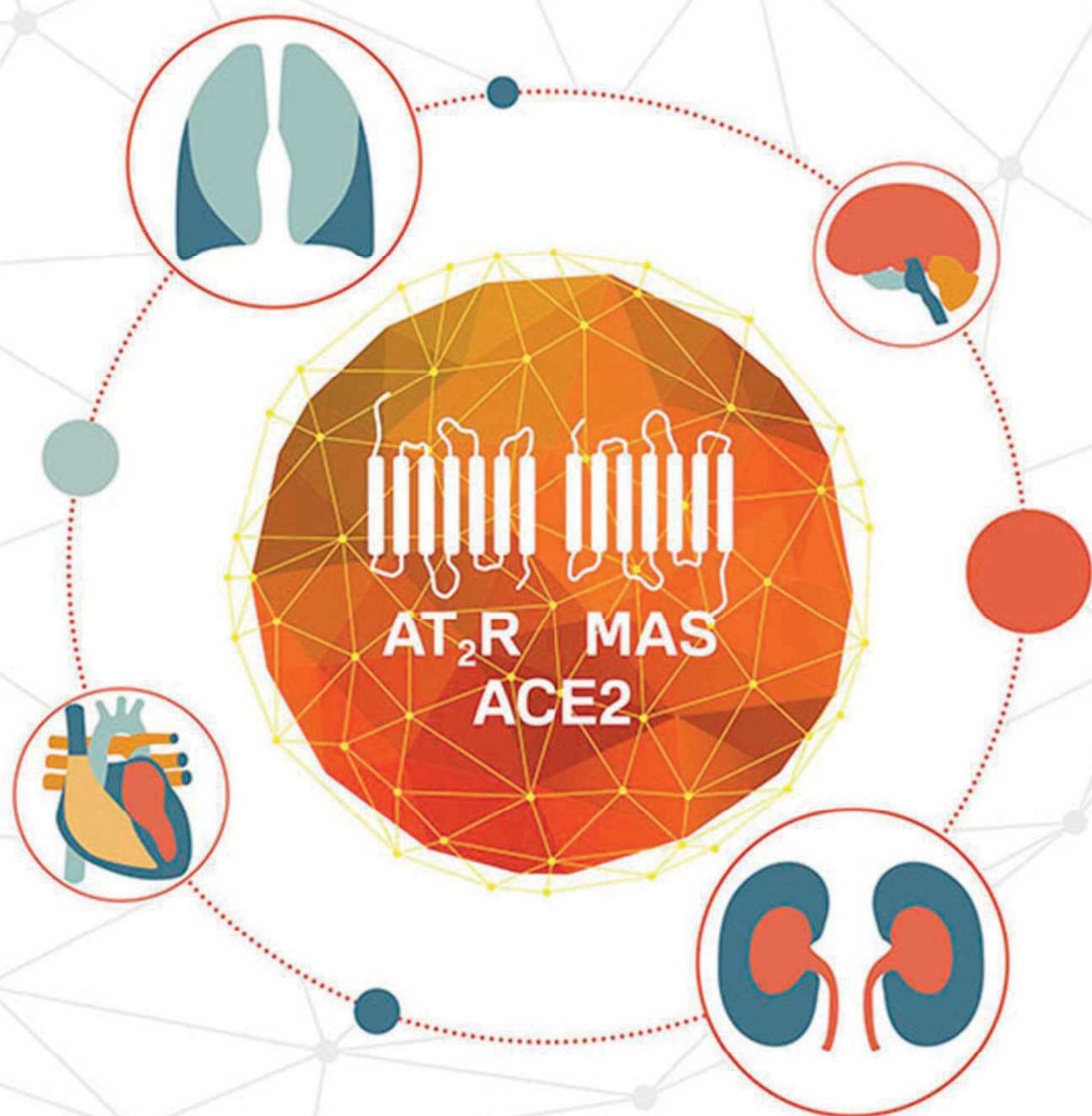
#### **The AT2 Receptor and Interacting Proteins (ATIPs) in Cancer**

Rodrigues-Ferreira S, Molina A, Nehlig A, Nahmias C

(The Protective Arm of the Renin–Angiotensin System (RAS), Elsevier, 2015)

# The Protective Arm of the Renin Angiotensin System

Functional Aspects and Therapeutic Implications



Edited by  
Thomas Unger, Ulrike M. Steckelings  
Robson A. S. dos Santos



# The AT<sub>2</sub> Receptor and Interacting Proteins (ATIPs) in Cancer

Sylvie Rodrigues-Ferreira, Angie Molina, Anne Nehlig, Clara Nahmias

Department of Molecular Medicine, Institut Gustave Roussy, INSERM U981, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France

## THE RENIN–ANGIOTENSIN SYSTEM AND CANCER

The renin–angiotensin system (RAS), a major regulator of blood pressure and cardiovascular homeostasis, is a complex enzymatic cascade that ultimately generates bioactive angiotensin peptides in the systemic circulation as well as locally in various tissues.<sup>1</sup> The “classical RAS” generates the angiotensin II (AngII) octapeptide through the cleavage of inactive AngI by angiotensin-converting enzyme (ACE) (Figure 1), whereas the “alternative RAS axis”<sup>2</sup> produces Ang-(1-7) by subsequent cleavage of AngII by the ACE homologue ACE2.

AngII binds to two receptor subtypes (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) and Ang-(1-7) binds to the Mas receptor (Figure 1). AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, and Mas all belong to the superfamily of seven-transmembrane domain receptors, but they display different and often opposite effects inside the cells. It is generally accepted that the classical ACE/AngII/AT<sub>1</sub> axis promotes the majority of RAS actions on cardiovascular, renal, and cerebral functions and that these effects are opposed by the activation of the AT<sub>2</sub> receptor<sup>3,4</sup> and of the “protective” ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis.<sup>2</sup>

The complexity of the RAS underlies its essential functions in a number of physiopathologic situations. Not surprisingly, over the past 10 years, the picture has emerged that dysregulation of RAS components may also play a role in various aspects of cancer.<sup>5–7</sup> Overexpression or activation of the ACE/AngII/AT<sub>1</sub> axis has been shown to facilitate tumor growth, vascularization, inflammation, and metastatic progression, by acting on both cancer cells and the tumor microenvironment.<sup>7,8</sup> In animal models, targeting the AT<sub>1</sub> receptor with selective receptor blockers has proved valuable to reduce tumor growth, macrophage recruitment, and metastatic dissemination. It has also been suggested that treatment with AT<sub>1</sub> receptor blockers may enhance chemotherapy efficacy by decompressing tumor vessels, thereby increasing drug delivery.<sup>9</sup> On the other hand, a number of studies have pointed to a beneficial role of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis against cancer, with pleiotropic effects on both tumor and stroma (review in Ref.<sup>10</sup>).

Given the complex interplay between different components of the classical and new arms of the RAS and the potential benefit of using AT<sub>1</sub> inhibitors and Mas agonists in cancer patients, it is of utmost importance to address the question of the role of the AT<sub>2</sub> receptor in cancer progression. Protective effects of AT<sub>2</sub> stimulation in cancer are expected due to the antiproliferative, antimigratory, and AT<sub>1</sub>-opposing effects often attributed to this receptor in various *in vivo* and cellular models. However, despite extensive studies, the consequences of AT<sub>2</sub> receptor overexpression or stimulation in cancer remain controversial. In the following section, we will summarize major studies that have been undertaken to evaluate whether the AT<sub>2</sub> receptor may be detrimental or protective against cancer.

## THE AT<sub>2</sub> RECEPTOR AND CANCER

The AT<sub>2</sub> receptor is abundantly expressed during fetal development and its expression levels fall abruptly at birth. In the adult, AT<sub>2</sub> expression is upregulated in pathophysiological situations involving tissue remodeling, inflammation, and/or repair. In line with these observations, AT<sub>2</sub> expression has been reported to be upregulated in cancer, a disease associated with extensive tissue remodeling and recruitment of inflammatory cells and molecules. Increased levels of AT<sub>2</sub> receptors have been detected by immunohistochemistry in a variety of human tumors (Table 1), including ductal and invasive breast carcinoma,<sup>11</sup> gastric cancer and lymph node metastases,<sup>12</sup> high-grade astrocytoma,<sup>13</sup> and high-grade renal cell carcinoma.<sup>14</sup> In some cases, increased AT<sub>2</sub> expression correlated with decreased survival in patients,<sup>13,14</sup> suggesting that this receptor may

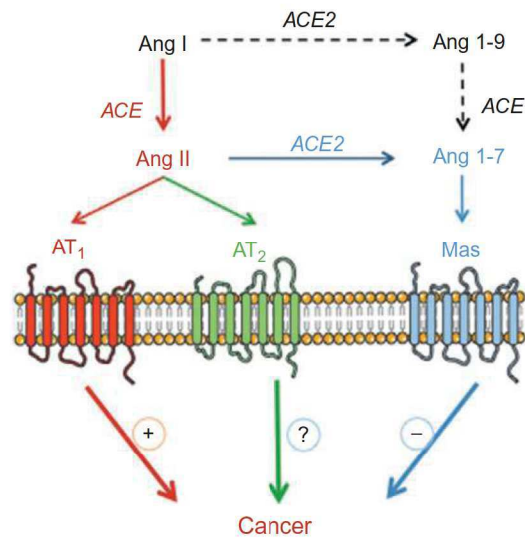


FIGURE 1 The renin–angiotensin system and cancer.

TABLE 1 AT<sub>2</sub> Receptor Expression in Human Cancer Samples

Cancer Type	IHC	ISH	PCR	References
Breast cancer	Increased	Increased	-	11
Gastric cancer	Increased	-	-	12
Astrocytoma	Increased	-	Increased	13
Kidney (RCCC)	Increased	-	No change	14
Prostate cancer	Decreased	-	-	15

IHC, immunohistochemistry; ISH, *in situ* hybridization; PCR, polymerase chain reaction.

be considered as a biomarker for tumor progression. To date, prostate cancer is the only malignancy in which AT<sub>2</sub> expression has been found to be downregulated rather than upregulated in high-grade tumors.<sup>15</sup>

It should be noted however that the specificity of commercially available anti-AT<sub>2</sub> antibodies has recently been challenged,<sup>16</sup> and caution should thus be taken in interpreting the results of IHC studies. Molecular analysis of AT<sub>2</sub> mRNA levels in human tumors has in some, but not all, cases confirmed the IHC results (Table 1). Further development of highly specific anti-AT<sub>2</sub>R antibodies is recommended before these studies can be translated into the clinic.

At the functional level, AT<sub>2</sub> receptor activation or overexpression in tumor cell lines of various origins has been shown to inhibit cell proliferation and induce apoptosis (Table 2), suggesting protective effects of this receptor on cancer cell growth.<sup>17–19</sup> Only one study, using AT<sub>2</sub> receptor deficiency or pharmacological blockade, suggested that AT<sub>2</sub> may be protumorigenic *in vitro* and *in vivo*.<sup>20</sup>

Animal studies led to highly contradictory results, possibly due to complex interactions between the tumor and stromal microenvironment and to different experimental settings. Indeed, AT<sub>2</sub> receptor-knockout mice studies<sup>20–23</sup> address the role of host stromal AT<sub>2</sub> receptors in cancer, whereas AT<sub>2</sub> receptor overexpression—by means of adenoviral transduction or nanoparticle injection—may target both cancer cells and the stromal microenvironment.<sup>24,25</sup> In different models of chemically induced mouse tumors, AT<sub>2</sub> deletion delayed tumor growth<sup>21,22</sup> through an indirect effect on metabolism of the carcinogen rather than by directly affecting cancer progression.

Thus, using different cancer cell types and mouse models, AT<sub>2</sub> was reported to be either protective or detrimental against cancer (Table 2), and to date, no clear picture can be drawn from these studies. It may be interesting to consider AT<sub>2</sub> effects in the context of the expression and/or activation of other RAS components in different cancer models, since activation of endogenous AT<sub>1</sub> or Mas receptors may compensate for AT<sub>2</sub> deficiency or be masked by AT<sub>2</sub> receptor overexpression.

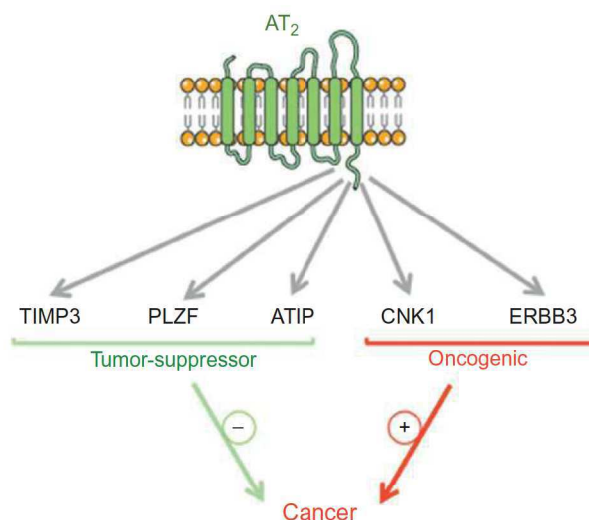
**TABLE 2** AT<sub>2</sub> Receptor Functional Effects in Cancer

Cancer Type	Cell Line	Experimental Model	<i>In Vitro</i> Effects	<i>In Vivo</i> Effects	References
Prostate	PC3, LnCap	AT <sub>2</sub> Ligands	Protective	nd	17
Prostate	DU145, PC3, LnCap	Ad-AT <sub>2</sub>	Protective	nd	18
Gastric	AGS, MKN28 NK87, MKN45	AT <sub>2</sub> antagonist	Protective Proinvasive	nd	12
Lung	A549, H358	Ad-AT <sub>2</sub> nanoparticle	Protective	nd	19
Colon	Carcinogen	AT <sub>2</sub> -null mice	nd	Detrimental	21
Lung	Carcinogen	AT <sub>2</sub> -null mice	nd	Detrimental	22
Fibrosarcoma	Carcinogen	AT <sub>2</sub> -null mice	Detrimental	Detrimental	20
Lung	LL/2	Antagonist PD		Detrimental	
Lung	LCC	Nanoparticle	Protective	Protective	24
Pancreatic	PAN02	AT <sub>2</sub> -null mice	Protective	Protective	23
Liver (HCC)	SMMC7221	Ad-AT <sub>2</sub>	Protective	Detrimental	25

Ad-AT<sub>2</sub>, adenoviral vector expressing AT<sub>2</sub>; nd, not determined.

## AT<sub>2</sub> RECEPTOR-INTERACTING PROTEINS (ATIPs) AND CANCER

Since its molecular cloning in 1995, AT<sub>2</sub> has been recognized as an atypical seven-transmembrane domain receptor coupled to unconventional signaling pathways. The search for AT<sub>2</sub> transducing molecules using yeast two-hybrid system has led to the identification of several AT<sub>2</sub> receptor-interacting partners that may serve as scaffolds to regulate its biological functions. AT<sub>2</sub> partners include the epidermal growth factor receptor ERBB3,<sup>26</sup> the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein,<sup>27</sup> the scaffold protein CNK1,<sup>28</sup> the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3),<sup>29</sup> and a family of AT<sub>2</sub> receptor-interacting proteins designated ATIPs<sup>30,31</sup> or ATBP.<sup>32</sup> All these proteins have been shown to interact with the C-terminal intracellular portion of the AT<sub>2</sub> receptor (Figure 2), raising the interesting possibility that AT<sub>2</sub> partners may form large macromolecular complexes with the receptor or may compete with each other for AT<sub>2</sub> interaction. However, to date, only a few of them, namely, PLZF and ATIPs/ATBP, have been functionally linked to AT<sub>2</sub> receptor functions.

**FIGURE 2** AT<sub>2</sub> receptor-interacting partners and cancer.

Of note, all identified AT<sub>2</sub> partners are related to cancer: ERBB3 (also designated HER3) and CNK1 are oncogenic, whereas PLZF, TIMP3, and ATIPs are associated with tumor suppression (Figure 2). Potential interactions of the AT<sub>2</sub> receptor with proteins showing either oncogenic or tumor-suppressor effects make it difficult to hypothesize on the functional consequences of AT<sub>2</sub> receptor expression or stimulation in cancer. It also remains unknown whether these interactions may result in the activation or inhibition of AT<sub>2</sub> signaling. Based on these observations, it may be possible that contradictory results regarding AT<sub>2</sub> effects in various cancer models may be due to relative expression levels and/or competition of different AT<sub>2</sub> receptor-interacting proteins for binding to the receptor.

ATIPs constitute to date the most extensively studied family of AT<sub>2</sub> receptor-interacting partners. Three major ATIP members (ATIP1, ATIP3, and ATIP4) are encoded by alternative promoter usage and exon splicing of the microtubule-associated tumor suppressor (*MTUS1*) gene.<sup>30,31,33</sup> All ATIPs are identical in their C-terminal portion containing the AT<sub>2</sub> receptor-interacting domain; however, only ATIP1 has been firmly demonstrated to interact with AT<sub>2</sub> in living cells. Notably, ATIP1 constitutively associates with the AT<sub>2</sub> receptor at the cell membrane and dissociates from the receptor upon AngII stimulation.<sup>30,31</sup> This isoform is involved in the transport of AT<sub>2</sub> receptor from the Golgi to the cell membrane<sup>32</sup> and contributes to AT<sub>2</sub> effects on cell growth inhibition, neuronal differentiation, neointima formation, vascular senescence, and adipose function.<sup>31,34,35</sup> A role for ATIP1 as a tumor suppressor in pancreatic cancer has also been reported independently of the AT<sub>2</sub> receptor.<sup>36</sup>

Downregulation of *MTUS1* gene expression in a variety of human cancers, including breast,<sup>37,38</sup> colon,<sup>39</sup> head-and-neck,<sup>40</sup> digestive system,<sup>41</sup> and bladder<sup>42,43</sup> tumors, supports its role as a major tumor suppressor in solid cancers, with the exception of prostate cancer<sup>15</sup> in which upregulation of *MTUS1* has been associated with tumor progression. Most studies however have not examined whether alterations of *MTUS1* expression affect ATIP1 or ATIP3 levels, or both.

Our group has identified the ATIP3 isoform as being the major *MTUS1* product downregulated in high-grade and metastatic breast tumors<sup>37</sup> and a novel prognostic biomarker of patient survival.<sup>38</sup> Its reexpression in ATIP3-negative breast cancer cells has profound inhibitory effects on breast cancer cell proliferation and migration, tumor growth, and metastasis,<sup>38</sup> making it an interesting therapeutic target for new breast cancer treatments. Growth-inhibitory effects of ATIP3 are AT<sub>2</sub>-independent, but it may be interesting to investigate whether a subpopulation of tumors coexpressing AT<sub>2</sub> and ATIP3 may benefit from AT<sub>2</sub> receptor stimulation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Inserm, the CNRS, the Institut Gustave Roussy, and the association Odyssea and Prolific.

## REFERENCES

1. Crowley SD, Coffman TM. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* 2012;**318**:1049–56.
2. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1–7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol* 2013;**216**:R1–17.
3. Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;**14**:958–72.
4. McCarthy CA, Widdop RE, Denton KM, Jones ES. Update on the angiotensin AT(2) receptor. *Curr Hypertens Rep* 2013;**15**:25–30.
5. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2005;**16**:293–9.
6. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010;**10**:745–59.
7. Wegman-Ostrosky T, Soto-Reyes E, Vidal-Millán S, Sánchez-Corona J. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2013. Epub ahead of print (doi:10.1177/1470320313496858).
8. Rodrigues-Ferreira S, Abdelkarim M, Dillenburg-Pilla P, Luissint AC, di-Tommaso A, Deshayes F, et al. Angiotensin II facilitates breast cancer cell migration and metastasis. *PLoS One* 2012;**7**:e35667.
9. Chauhan VP, Martin JD, Liu H, Lacorre DA, Jain SR, Kozin SV, et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat Commun* 2013;**4**:2516.
10. Gallagher PE, Arter AL, Deng G, Ann Tallant E. Angiotensin-(1–7): A peptide hormone with anti-cancer activity. *Curr Med Chem* 2014. [Epub ahead of print].
11. De Paepe B, Verstraeten VM, De Potter CR, Bullock GR. Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 2002;**117**:13–9.
12. Carl-McGrath S, Ebert MP, Lendeckel U, Röcken C. Expression of the local angiotensin II system in gastric cancer may facilitate lymphatic invasion and nodal spread. *Cancer Biol Ther* 2007;**6**:1218–26.
13. Arrieta O, Pineda-Olivera B, Guevara-Salazar P, Hernández-Pedro N, Morales-Espinosa D, Cerón-Lizarraga TL, et al. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 2008;**99**:160–6.

14. Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer* 2010;**103**:1698–705.
15. Guimond MO, Battista MC, Nikjoutavabi F, Carmel M, Barres V, Doueik AA, et al. Expression and role of the angiotensin II AT2 receptor in human prostate tissue: in search of a new therapeutic option for prostate cancer. *Prostate* 2013;**73**:1057–68.
16. Hafko R, Villapol S, Nostramo R, Symes A, Sabban EL, Inagami T, et al. Commercially available angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor antibodies are non-specific. *PLoS One* 2013;**8**:e69234.
17. Chow L, Rezmann L, Imamura K, Wang L, Catt K, Tikellis C, et al. Functional angiotensin II type 2 receptors inhibit growth factor signaling in LNCaP and PC3 prostate cancer cell lines. *Prostate* 2008;**68**:651–60.
18. Li H, Qi Y, Li C, Braseth LN, Gao Y, Shabashvili AE, et al. Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009;**8**:3255–65.
19. Pickel L, Matsuzuka T, Doi C, Ayuzawa R, Maurya DK, Xie SX, et al. Overexpression of angiotensin II type 2 receptor gene induces cell death in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2010;**9**(4):277–85.
20. Clere N, Corre I, Faure S, Guihot AL, Vessières E, Chalopin M, et al. Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int J Cancer* 2010;**127**:2279–91.
21. Takagi T, Nakano Y, Takekoshi S, Inagami T, Tamura M. Hemizygous mice for the angiotensin II type 2 receptor gene have attenuated susceptibility to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2002;**23**:1235–41.
22. Kanehira T, Tani T, Takagi T, Nakano Y, Howard EF, Tamura M. Angiotensin II type 2 receptor gene deficiency attenuates susceptibility to tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis: involvement of transforming growth factor-beta-dependent cell growth attenuation. *Cancer Res* 2005;**65**:7660–5.
23. Doi C, Egashira N, Kawabata A, Maurya DK, Ohta N, Uppalapati D, et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling significantly attenuates growth of murine pancreatic carcinoma grafts in syngeneic mice. *BMC Cancer* 2010;**10**:67.
24. Kawabata A, Baoum A, Ohta N, Jacquez S, Seo GM, Berkland C, et al. Intratracheal administration of a nanoparticle-based therapy with the angiotensin II type 2 receptor gene attenuates lung cancer growth. *Cancer Res* 2012;**72**:2057–67.
25. Du H, Liang Z, Zhang Y, Jie F, Li J, Fei Y, et al. Effects of angiotensin II type 2 receptor overexpression on the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013;**8**:e83754.
26. Knowle D, Ahmed S, Pulakat L. Identification of an interaction between the angiotensin II receptor sub-type AT2 and the ErbB3 receptor, a member of the epidermal growth factor receptor family. *Regul Pept* 2000;**87**:73–82.
27. Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price Jr E, Roberts RL, et al. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2003;**22**:6471–82.
28. Fritz RD, Radziwill G. The scaffold protein CNK1 interacts with the angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**338**:1906–12.
29. Kang KH, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;**79**:150–60.
30. Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, et al. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein. ATIP. *J Biol Chem* 2004;**279**:28989–97.
31. Rodrigues Ferreira S, Nahmias C. An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor interacting proteins. *Trends Endocrinol Metab* 2010;**21**:684–90.
32. Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Schefe JH, et al. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:57–64.
33. Di Benedetto M, Bièche I, Deshayes F, Vacher S, Nouet S, Collura V, et al. Structural organization and expression of human MTUS1, a candidate 8p22 tumor suppressor gene encoding a family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. ATIP. *Gene* 2006;**380**:127–36.
34. Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, et al. Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein prevents vascular senescence. *J Am Soc Hypertens* 2012;**6**:179–84.
35. Jing F, Mogi M, Min LJ, Ohshima K, Nakaoka H, Tsukuda K, et al. Effect of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein on adipose tissue function via modulation of macrophage polarization. *PLoS One* 2013;**8**:e60067.
36. Seibold S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J* 2003;**17**:1180–2.
37. Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A, Cazaubon S, Gruel N, Colasson H, et al. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One* 2009;**4**:e7239.
38. Molina A, Velot L, Ghouinem L, Abdelkarim M, Bouchet BP, Luissint AC, et al. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res* 2013;**73**:2905–15.
39. Zuern C, Heimrich J, Kaufmann R, Richter KK, Settmacher U, Wanner C, et al. Down-regulation of MTUS1 in human colon tumors. *Oncol Rep* 2010;**23**:183–9.
40. Ding X, Zhang N, Cai Y, Li S, Zheng C, Jin Y, et al. Down-regulation of tumor suppressor MTUS1/ATIP is associated with enhanced proliferation, poor differentiation and poor prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Mol Oncol* 2012;**6**:73–80.
41. Li X, Liu H, Yu T, Dong Z, Tang L, Sun X. Loss of MTUS1 in gastric cancer promotes tumor growth and metastasis. *Neoplasma* 2014;**61**:128–35.
42. Xiao J, Chen JX, Zhu YP, Zhou LY, Shu QA, Chen LW. Reduced expression of MTUS1 mRNA is correlated with poor prognosis in bladder cancer. *Oncol Lett* 2012;**4**:113–8.
43. Rogler A, Hoja S, Giedl J, Ekici AB, Wach S, Taubert H, et al. Loss of MTUS1/ATIP expression is associated with adverse outcome in advanced bladder carcinomas: data from a retrospective study. *BMC Cancer* 2014;**14**:214.







**Titre :** La protéine ATIP3 et ses partenaires d'interaction : de nouvelles cibles thérapeutiques contre le cancer du sein

**Mots clés :** cancer du sein ; microtubule ; fuseau mitotique ; biomarqueur ; protéomique

**Résumé :** Le cancer du sein touche une femme sur neuf dans le monde et constitue un problème majeur de santé publique. L'identification de nouveaux biomarqueurs pour un traitement personnalisé pour les tumeurs du sein de plus mauvais pronostic, dites « triple-négatives », est extrêmement urgent. ATIP3, le produit majeur du gène candidat suppresseur de tumeurs *MTUS1*, a été identifié par l'équipe comme étant un biomarqueur des tumeurs du sein les plus agressives. De plus, ATIP3 inhibe la prolifération et la migration *in vitro*, ainsi que la progression tumorale et la formation de métastases *in vivo* et constitue une cible thérapeutique. ATIP3 est une protéine associée aux microtubules (MT) en interphase et au fuseau mitotique durant la mitose. Mon projet de thèse a pour objectif principal d'identifier les partenaires d'interaction d'ATIP3 impliqués dans ses mécanismes d'action antitumoraux. Dans une première partie, j'ai montré qu'ATIP3 interagit avec EB1, une protéine majeure de la dynamique du MT. L'interaction ATIP3-EB1 diminue l'accumulation d'EB1 à l'extrémité croissante du MT.

Un nouveau mécanisme a été proposé dans lequel l'interaction ATIP3-EB1 réduit indirectement la vitesse d'échange d'EB1 à son site de liaison au bout plus du MT, ayant pour conséquence une diminution de la dynamique du MT. Dans une deuxième partie, j'ai montré qu'une déplétion d'ATIP3 induit une réduction de la taille du fuseau mitotique. Une analyse protéomique a permis d'identifier la kinésine Kif2A comme partenaire d'interaction d'ATIP3. ATIP3 forme un complexe avec Kif2A et Dda3 qui est dépendant d'une phosphorylation par Aurora kinase A. ATIP3 maintient la taille du fuseau en diminuant le recrutement de Kif2A et Dda3 au pôle de façon dépendante d'AurKA. ATIP3 régule donc négativement ses partenaires d'interaction. Enfin, dans une troisième partie, la pertinence clinique du couple ATIP3-EB1 a été évaluée et j'ai montré que l'expression combinée des deux biomarqueurs ATIP3 et EB1 était associée à l'agressivité de la tumeur et à une survie diminuée.

Ainsi, l'ensemble de mes travaux a permis de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques afin de mettre en place des traitements personnalisés.

**Title :** Microtubule-associated protein ATIP3 and interacting partners : new therapeutic targets against breast cancer

**Keywords :** breast cancer ; microtubule dynamics ; mitotic spindle ; biomarker; proteomics

**Abstract :** Breast cancer is a leading cause of death by malignancy in women worldwide. The identification of new molecular markers for personalized treatment of poor prognosis breast tumors, such as those of the triple negative subtype, is urgently needed. Our team is leader in the study of ATIP3 protein, encoded by candidate tumor suppressor gene *MTUS1*. ATIP3 is down-regulated in 85% of triple negative breast tumors, and low levels of ATIP3 are associated with poor survival of the patients. We have shown that ATIP3 reduces proliferation and migration *in vitro*, and tumor growth and metastasis formation *in vivo*. ATIP3 localizes along the microtubule (MT) in interphase and on the mitotic spindle and spindle poles during mitosis. My PhD project aimed at identifying ATIP3 partners involved in its anti-tumoral effects. In the first part, I will present data showing that ATIP3 interacts with EB1, a major regulator of MT dynamics. ATIP3-EB1 interaction prevents EB1 accumulation at MT growing ends.

I proposed a novel mechanism by which ATIP3-EB1 indirectly reduces EB1 turnover at its binding site at MT plus end, which consequently reduces MT dynamics. In the second part of my thesis, I showed that ATIP3 silencing induces reduced spindle length. In parallel, I identified the MT-depolymerizing kinesin Kif2A as an ATIP3 partner by proteomic analysis. ATIP3 forms a complex with Kif2A and Dda3 in an AurKA-dependent manner. I showed that ATIP3 maintains mitotic spindle size by inhibiting Kif2A and Dda3 recruitment at the spindle pole. My study also revealed a reciprocal regulation between ATIP3 and AurKA. Thus, ATIP3 negatively regulates its binding partners. Finally, in a third part, clinical relevance of ATIP3-EB1 in breast cancer has been evaluated and I showed that combinatorial expression of ATIP3 and EB1 is associated with tumor aggressiveness and reduced patient survival. Altogether, this work highlighted new therapeutic targets to propose personalized treatments.