



**HAL**  
open science

# Interrelations entre les filaments de septines, les microfilaments d'actine et les microtubules : adaptations fonctionnelles en réponse aux taxanes

Joelle Salameh

## ► To cite this version:

Joelle Salameh. Interrelations entre les filaments de septines, les microfilaments d'actine et les microtubules : adaptations fonctionnelles en réponse aux taxanes. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ008 . tel-03288228

**HAL Id: tel-03288228**

**<https://theses.hal.science/tel-03288228>**

Submitted on 16 Jul 2021

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

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

Interrelations entre les filaments de septines, les microfilaments d'actine et les microtubules : adaptations fonctionnelles en réponse aux taxanes

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 569, innovation thérapeutique :  
du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat: Physiologie, physiopathologie  
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm,  
Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie,  
94800, Villejuif, France.  
Réfèrent : Faculté de Pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry,  
le 11 Février 2021, par**

**Joëlle SALAMEH**

**Composition du Jury**

**Clara NAHMIAS**

Directrice de Recherche, Institut Gustave Roussy  
Université Paris-Saclay

Présidente

**Aurélie BERTIN**

Chargée de recherche, HDR, Institut Curie, Sorbonne  
Université

Rapporteuse &  
Examinatrice

**Ali BADACHE**

Directeur de Recherche, Centre de recherche en  
Cancérologie de Marseille, Aix- Marseille Université

Rapporteur &  
Examineur

**Arnaud ECHARD**

Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Sorbonne  
Université

Examineur

**Christian POÛS**

Professeur, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

**Anita BAILLET**

Maîtresse de conférences, Université Paris-Saclay

Co-encadrante de thèse

# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de mon Jury, mes rapporteurs Mme Aurélie Bertin et Mr Ali Badache et mes examinateurs Mme Clara Nahmias et Mr Arnaud Echard, pour avoir pris le temps de lire et juger mon travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Christian Poüs et ma co-encadrante de thèse Anita Baillet, tout d'abord pour cette chance qu'ils m'ont accordée. Deuxièmement, pour leur disponibilité, leur soutien constant, particulièrement dans la rédaction de ce manuscrit et du papier. Leur attitude positive face à chaque défi est quelque chose à admirer et une leçon que j'ai apprise.

Un grand merci à la meilleure assistante ingénieure du monde (oui, oui je n'exagère pas), Isabelle Cantaloube, non seulement pour l'énorme support technique mais également pour le support émotionnel constant. Merci Isa pour ton encouragement, pour le chocolat sur mon bureau après une mauvaise journée, pour les découvertes culinaires, pour ta disponibilité dans n'importe quelle situation...la liste est très longue.

Ameetha, thank you for the constant support, advice, for always being there for me when needed. Béatrice, merci de m'avoir toujours poussé à viser plus haut, à participer à des congrès, et surtout merci pour le sapin de Noël au labo chaque année que j'adorais. Najet, grand merci pour ton aide pendant l'enseignement. Philippe, merci pour nos conversations à propos du Liban, pour les petits gâteaux libanais que tu partageais avec moi et pour les gadgets que tu nous ramenaes de tes voyages. Arnaud, Antoine, Elise, Daniel, merci pour la très bonne ambiance au labo.

Je tiens à remercier également les doctorants, stagiaires, post-docs et personnel technique du labo avec qui j'ai passé un super bon moment : Maya, Dalal, Walid, Samra, Sara, Claude et Eléonore et tous les membres de l'ADIT.

Je voudrais remercier également mes formidables parents sans qui je ne serais pas là où je suis aujourd'hui et mon frère, my role model.

Un grand merci à la famille que j'ai choisie, mes amis. Même éparpillés aux quatre coins du monde, on n'a jamais perdu contact et votre soutien constant comptait beaucoup pour moi.

## Avant-propos

Les septines sont une famille de GTPases conservée évolutivement de la levure jusqu'aux mammifères. Chez l'homme, on compte 13 septines, subdivisées en quatre groupes en fonction de leur homologie de séquence. Elles s'assemblent en hétéro-hexamères ou hétéro-octamères qui peuvent s'associer bout à bout pour former des structures d'ordre supérieur telles que des filaments. Les septines sont impliquées dans plusieurs événements cellulaires en tant que protéines d'échafaudage ou barrières de diffusion. Du fait de leur organisation en filaments, les septines sont considérées comme un nouvel élément du cytosquelette et dans un même type cellulaire, elles s'associent majoritairement soit aux microtubules, soit à l'actine. Dans ce dernier cas, très majoritaire, le coalignement s'effectue avec l'actine corticale et les fibres de stress. Dans la littérature, l'implication des septines dans divers processus cellulaires, en mitose comme en interphase, est grandissante et dépend de leur localisation subcellulaire et de leur(s) partenaire(s) de liaison. Il est donc important de comprendre les mécanismes qui contrôlent leur emplacement final au sein de la cellule.

Au laboratoire, de façon intéressante, un changement de localisation subcellulaire des septines a été mis en évidence au sein d'un même type cellulaire, lors de la découverte d'un nouveau mécanisme de résistance des cellules tumorales mammaires MDA-MB 231 exposées à long terme au paclitaxel, un agent stabilisateur des MTs utilisé en chimiothérapie. Brièvement, une analyse comparative du protéome de l'environnement microtubulaire des cellules MDA-MB 231 sensibles et rendues résistantes au paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2011) a mis en évidence la surexpression d'un pool de septines, dont l'isoforme 1 de SEPT9, connue pour être de mauvais pronostic. Les septines qui sont associées aux fibres de stress dans la lignée sensible se retrouvent associées aux microtubules dans la lignée résistante, en particulier aux microtubules dont la polyglutamylation à longue chaîne est accrue (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Sur ces microtubules, il a été mis en évidence que les septines servaient de protéines d'échafaudage pour recruter les polyglutamylases (Tubulin Tyrosine Ligase-Like: TTLL) et les carboxypeptidases (CCP) qui contrôlent la longueur des chaînes de glutamate sur la tubuline polymérisée. En aval, le recrutement sur les microtubules des facteurs de sauvetage et de catastrophe, respectivement CLIP-170 et MCAK, est accru, accélérant la dynamique microtubulaire pour contrecarrer l'effet stabilisateur du paclitaxel.



Alors que ce nouveau mécanisme de résistance au paclitaxel a été découvert dans des cellules adaptées au long cours, j'ai été impliquée, dès mon arrivée en thèse, dans l'étude des effets d'un traitement en aigu par le paclitaxel sur la localisation subcellulaire des septines et l'acquisition de la résistance à cette drogue. Nous avons observé qu'une exposition brève au paclitaxel de plusieurs lignées cellulaires sensibles aux taxanes relocalisaient leurs filaments de septines de l'actine vers les microtubules, dès lors qu'elles possédaient une expression basale de SEPT9\_i1 élevé (Targa et al., 2019). Bien qu'une telle relocalisation des septines dans chacun des types cellulaires analysés ait été corrélée à l'acquisition d'une chimiorésistance, aucune surexpression de septines, ni augmentation de polyglutamylation des microtubules n'a été retrouvée dans ces conditions de traitement, suggérant que d'autres déterminants moléculaires responsables de la relocalisation subcellulaire des septines devaient exister.

Ainsi, les principaux objectifs de ma thèse étaient :

- 1) D'identifier les acteurs impliqués dans le contrôle de la localisation subcellulaire des septines en condition basale et suite à un traitement aigu par le paclitaxel. Je me suis intéressée particulièrement à la protéine BORG2 de la famille de 5 membres des « Binder of Rho GTPases », une protéine effectrice de Cdc42 connue pour lier les septines à l'actine en interphase. Bien que ces protéines restent largement méconnues, leur implication via leur association aux septines dans la progression tumorale avait déjà été identifiée, et elles apparaissaient comme pouvant être de bons candidats pour contrôler la localisation des septines dans la cellule.
- 2) De comprendre le rôle des microtubules et de leurs moteurs moléculaires dans l'adressage des filaments de septines vers les fibres de stress. En effet, la dépolymérisation des microtubules inhibe la localisation des septines sur les fibres de stress.

La localisation subcellulaire et la relocalisation des septines de l'actine vers les microtubules, est étroitement corrélée à la résistance des cellules sensibles aux traitements par les taxanes. Ainsi, l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans ces régulations pourrait permettre de suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques.

## Liste des tableaux et figures

- Liste des figures :

Figure 1: Les différentes étapes de polymérisation des microtubules .....	17
Figure 2: Représentation du dimère de tubuline, extrait d'une figure de l'article (Amos, 2004).....	18
Figure 3: Schéma représentant les différentes modifications post-traductionnelles de la tubuline	22
Figure 4: Nucléation de l'assemblage des microtubules par $\gamma$ -TuRC .....	23
Figure 5: Schéma représentant l'instabilité dynamique des microtubules .....	26
Figure 6: Schéma représentant le « treadmilling » des MTs in vitro .....	27
Figure 7: Dynéine et kinésine, les moteurs moléculaires des MTs .....	30
Figure 8: Trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi .....	35
Figure 9: Localisation intracellulaire des Rab .....	37
Figure 10: Représentation d'un filament d'actine et de son dynamisme.....	40
Figure 11: Les différentes étapes du dynamisme des filaments d'actine.....	41
Figure 12: Les différentes organisation de l'actine.....	43
Figure 13: Le modèle de formation du réseau d'actine dendritique .....	44
Figure 14: L'organisation des microvillosités.....	45
Figure 15: Les différentes populations de fibres de stress.....	46
Figure 16 : Bourgeon de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vu en microscopie électronique .....	51
Figure 17: Les différents domaines des septines.....	53
Figure 18: Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines.....	54
Figure 19: La structure du cristal de l'hétéro-hexamère de septines selon (Sirajuddin et al., 2007)	55
Figure 20: Illustration de l'hétéro-octamère de septines.....	56
Figure 21: La structure du cristal de l'hétéro-hexamère de septines selon (Mendonça et al., 2019) .....	57
Figure 22: Illustration alternative des hétéro-hexamères et hétéro-octamères où les extrémités sont compatibles pour la polymérisation selon Soroor et al., 2020.....	57
Figure 23: Les différents modèles de polymérisation des septines humaines et de la levure .....	58
Figure 24: Structures d'ordre supérieur des septines .....	59
Figure 25: Les septines reconnaissent des courbures de la membrane plasmique de l'ordre du micron .....	61
Figure 26: La formation d'anneaux de septines après dépolymérisation de l'actine par la cytochalasine D dans les fibroblastes NIH3T3 .....	63
Figure 27: Effet de la dépolymérisation de l'actine ou des microtubules sur l'organisation des septines contenant MSF-A (SEPT9) dans les cellules HMEC où elles sont localisées majoritairement sur les MTs dans des conditions basales.....	64
Figure 28: Le cycle d'activation et d'inactivation de Cdc42 .....	65
Figure 29: Le modèle de recrutement des septines au site de bourgeonnement.....	67
Figure 30: L'anneaux de septines durant le bourgeonnement de <i>C. albicans</i> durant la cytokinèse..	69
Figure 31: Schéma montrant les différentes parties d'un spermatozoïde .....	69
Figure 32: Schéma d'un cil isolé du cytoplasme grâce à une barrière formée de plusieurs composants dont les septines .....	70
Figure 33: Schéma montrant la présence d'un anneau de septines à la base des épines dendritiques .....	71
Figure 34: Les différentes étapes de la cytokinèse chez les mammifères .....	73

Figure 35: La transition des filaments de septines, de la structure en forme de sablier en double anneaux chez la levure .....	75
Figure 36: Changement de la conformation cellulaire des cellules T après un knockdown de SEPT7 (KD#1).....	75
Figure 37: Colocalisation des filaments de septines et d'actine dans les cellules HHL16 en interphase .....	78
Figure 38: Coalignement des septines des cellules MDCK avec les microtubules en interphase (A) et en mitose (B).....	80
Figure 39: Colocalisation des septines chez les MDCK avec les MTs nucléés par l'appareil de Golgi, détecté par la protéine résidente Furine .....	80
Figure 40: Schéma représentant les événements et les régulateurs impliqués dans les branchements collatéraux des axones .....	84
Figure 41: Le rôle des septines dans la prévention de la dissémination du virus de la vaccine .....	86
Figure 42: Le rôle des septines dans l'inhibition de la division de la bactérie Shigella flexneri .....	87
Figure 43: Schéma représentant les différents domaines des protéines BORG.....	93
Figure 44: Effet des formes constitutivement actives et inactives de Cdc42 sur Cdc42EP3/BORG2 (A et B), la F-actine (A) et les septines (B) dans les CAFs exprimant de façon stable Cdc42EP3 .....	96
Figure 45: Effet de la surexpression de Cdc42EP3/BORG2 sur l'organisation des septines et de l'actine dans les CAFs.....	102
Figure 46: Site de liaison des différents agents ciblant les microtubules.....	104
Figure 47: Structure chimique du paclitaxel.....	108
Figure 48: Effet de différents agents anti-cancéreux sur le cytosquelette d'actine dans les cellules HUVEC .....	111
Figure 50: Mécanisme de résistance à long terme au paclitaxel dans les cellules de carcinome mammaire MDA-MB 231.....	192
Figure 51: Fluorescence émise par le GFP de Cdc42-Q61L suggérant la présence de la forme active de Cdc42 sur les fibres de stress.....	200
Figure 52: Mécanisme de relocalisation des septines sur les microtubules à l'origine d'une résistance en réponse à un traitement aigu par du paclitaxel dans les HHL16.....	202
Figure 53: Mécanisme hypothétique de l'implication des microtubules dans la formation des filaments de septines et leur livraison aux fibres de stress .....	207

- Liste des tableaux :

Tableau 1: Transcrits et isoformes de gènes et pseudogènes de septines humaines (En se basant sur la base de données Genbank®) .....	52
Tableau 2: Gènes et transcrits codant les protéines BORG humaines.....	91
Tableau 3: Implication des protéines BORG dans le remodelage du cytosquelette d'actine .....	100
Tableau 4: Impact de la surexpression des différents acteurs du mécanisme de résistance au paclitaxel identifié par (Froidevaux-Klipfel et al., 2015) sur la résistance de différentes lignées cellulaires au paclitaxel et sur la localisation subcellulaire des septines .....	195

## Liste des abréviations

- Abl: Abelson Murine Leukemia
- ACF: Actin Crosslinking Factor
- ADF: Actin Depolymerizing Facctor
- ADN: Acide Déoxyribonucléique
- AF: Adhérences Focales
- Aig: Androgen induced gene
- Aip: Actin-interacting protein
- AKAP: A-Kinase Anchoring Protein
- Alp: Altered polarity protein
- APC: Adenomatous Polyposis Coli
- aPKC: atypical Protein Kinase C
- AR: Androgen Receptor
- ARNm: Acide Ribonucléique messenger
- Arp: Actin related protein
- ATIP3 (AT2 receptor-interacting protein)
- ATP: Adenosine Triphosphate
- Axl: Axial budding pattern protein
- BCL: B-Cell Lymphoma
- BD : Borg Domain
- BH: BORG Homology
- BHK: Baby Hamster Kidney
- BIM: Bccl-2 Interacting Mediator of cell death
- Bin : Bridging Integrator
- Bni: Bud Neck Involved
- BORG : Binder of Rho GTPase
- BORG: Bonder of Rho Guanosine triphosphatase
- C.Albicans: Candida Albicans
- C.Elegans: Caenorhabditis elegans
- Caco: Colorectal adenocarcinoma
- CAF: Cancer Associated Fibroblast
- CAP-Gly: Cytoskeleton associated protein glycine rich
- Cbl : Casitas B-lineage Lymphoma
- CCP: Cytosolic Carboxypeptidase
- Cdc: Cell division cycle
- Cdc42EP: Cell division cycle 42 Effective Protein
- Cdk: Cyclin-dependent kinase
- Cdx: Caudal type homeobox

- CENP-E: Centromere Protein E
- CEP: Cdc Effector Protein
- CEV: Cell-Associated Enveloped Virus
- CH: Calponin Homology
- CHC: Carcinome Hepatocellulaire
- CHO: Chinese Hamster Ovary
- Chs: Chitin Synthase
- Ch-TOG: colonic and hepatic Tumor Overexpressed Gene
- Cik: Clavata3 Insensitive Receptor Kinase
- CIN85: Cbl-Interacting 85-kDa protein
- CLASP: CLIP Associated Proteins
- CLIMP: Cytoskeleton linking membrane protein
- CLIP: Cytoplasmic Linker Protein
- Cobl: Cordon-bleu protein
- COP: Coat Protein
- Cos: CV-1 (simian) in Origin and carrying the SV40 genetic material
- CRIB: Cdc42 and Rac-interactive Binding
- DIAPH: Diaphanous Homologous protein
- Dis: Defect in sister chromatid disjoining
- EB: End Binding
- EBH: End Binding Homology
- EE: Early Endosome
- EGFR: Epithelial Growth Factor Receptor
- E-MAP: Epithelial MAP
- EMT: Epithelial Mesenchymal Transition
- Erb : Erythloblastic leukemia viral oncogene
- ERGIC: Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment
- ERK: Extracellular signal Regulated Kinase
- ERLIN: Endoplasmic Reticulum Lipid raft associated protein
- ESCRT: Endocytic Sorting Complex Required for Transport
- EST: Expressed Sequence Tag
- FAK: Focal Adhesion Kinase
- FDA: Food and Drug Administration
- FoxM: Forkhead box protein M
- FtsZ: Filamenting Temperature Sensitive Z
- GAP: GTPase Activating Protein
- GCC: Guanylyl cyclase C
- GDP: Guanosine Diphosphate
- GEF : Guanine Nucleotide Exchange Factor
- GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor
- GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor
- Gic: GTPase interacting component

- GM: Golgi Matrix
- Grb: Growth factor receptor-bound protein
- GTP: Guanosine Triphosphate
- HAUS: Homologous to augmin subunits
- HDAC: Histone Deacetylase
- HER: Human Epidermal factor Receptor
- HGF: Hepatocyte Growth Factor
- HHL: Human Hepatic Cell Line
- HIF: Hypoxia Inducible Factor
- HMEC: Human Mammary Epithelial Cells
- HSP: Heat-Shock Protein
- HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
- IC: Inhibition Concentration
- IEV: Intracellular Enveloped Virus
- IQGAP: IQ motif containing GTPase Activating Protein
- IRE: Internal Ribosomal Entry
- Ist2p: Increased sodium tolerance protein
- JNK: c-Jun N-terminal Kinase
- Kar: Kinesine related
- KD: Knockdown
- KHC: Kinesin Heavy Chain
- KIF: Kinesin Family
- KO: Knockout
- L/V: Lysosome/Vacuole
- LD: Lipid Droplet
- LE: Late Endosome
- Lte: Low temperature essential protein
- MACF: Microtubule and Actin Crosslinking Factor
- MalE: Maltose
- MAP: Microtubule Associated Proteins
- MAPK: Microtubule Associated Protein Kinase
- MAPKAP : Microtubule Associated Protein Kinase Associated Protein
- MARK: MAP/Microtubule affinity-regulating kinase
- MBP: Maltose binding protein
- MCAK: Mitotic centromere-associated kinesin
- MCF: Michigan Cancer Foundation
- MDA-MB: MD Anderson Metastatic Breast Cancer
- MDCK: Madin-Darby Canine Kidney
- mDia: mammalian homolog of Drosophila diaphanous
- MEC: MEChanosensory problem
- MEN : Mitotic Exit Network
- MG132 : Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal

- MKLP: Mitotic Kinesin Like Protein
- MLC: Myosin Light Chain
- MLL: Mixed Lineage Leukemia
- MMP: Matrix Metallo Protease
- MOR: Microtubule Organization
- MRP: Multidrug Resistance-associated Protein
- MSE: Marrow Stromal Endothelial
- MSF: Mitochondrial import Stimulation Factor
- Msps: Mini Spindles
- MT: Microtubule
- MTOC: Microtubule Organizing Center
- MTUS1 (Microtubule-associated TUmor Suppressor 1)
- NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
- NCI: National Cancer Institute
- NCK: Non-Catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
- ncMTOC: non-centrosomal Microtubule Organizing Center
- NCS: Neuronal Calcium Sensor
- NF: Nuclear Factor
- NIH3T3: National Institute of Health 3T3
- OCRL: Lowe oculocerebrorenal syndrome protein
- PAS: Preatophagosomal Structure
- PB: Polybasique
- PCM: Pericentriolar Material
- P-gp: P-glycoprotein
- PIP: Phosphatidylinositol Phosphate
- PKC: Protein Kinase C
- PUMILIO: Pumilio Homolog
- Rab: Ras-associated binder
- Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate
- Ran: Ras like nuclear protein
- Ras: Rat sarcoma
- RE: Recycling Endosome
- RE: Réticulum Endoplasmique
- Rho: Ras homolog
- Rock: Rho-associated protein kinase
- ROS: Reactive Oxygen Species
- RPE: Retinal pigment epithelium
- *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*
- Scr: Sex combs reduced
- SDF: Stromal cell Derived Factor
- SEPT: Septin
- SEPT9\_i1: Septin 9 isoform 1

- SF: Stress Fiber
- Sirt: Sirtuin
- SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor
- Src: Sarcoma
- Srv2/CAP: Cyclase Associated Protein
- SSNA: Sjogren Syndrome Nuclear Autoantigen
- Stu: Suppressor of tubulin beta chain
- SV: Secretory Vesicle
- SVBP: Small Vasohibin Binding Protein
- Swe: Saccharomyces Wee
- TC: T Cells
- TEF: Tumor Endothelial Marker
- TEM: Termination M phase
- TGF: Tumor Growth Factor
- TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence
- TKI: Tyrosine Kinase
- TNF : Tumor Necrosis Factor
- Toc: Translocon of the outer envelope of chloroplasts
- TOG: Tumor Overexpressed Gene
- TP: Targeting protein
- TTL: Tubulin Tyrosine Ligase
- TTLL: Tubulin Tyrosine Ligase-Like
- Unc: Uncoordinated protein
- USDA: United States Department of Agriculture
- UTR: Untranslated Region
- UTR: Untranslated Transcribed Region
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
- WASP: Wiskott Aldrich Syndrome Protein
- WIP: WASP Interacting Protein
- Xklp: Xenopus Centrosomal kinesin-like protein
- XMAP: Xenopus Microtubule Associated Protein
- ZYG: Zygote defective protein
- $\alpha$ -Tat: Alpha Tubuline Acetyltransferase
- $\gamma$ -TuRC: Gamma Tubulin Ring Complex



## Table des matières

Remerciements .....	1
Avant-propos.....	2
Liste des tableaux et figures.....	4
Liste des abréviations .....	6
Introduction générale.....	15
Partie I : Les Microtubules.....	16
I. Structure et composition des microtubules.....	16
II. Principaux domaines fonctionnels de la tubuline et leurs fonctions .....	17
III. Polymorphisme.....	18
III.I Les différents isotypes de tubuline .....	18
III. II Les modifications post-traductionnelles .....	19
III.II.A L'acétylation .....	19
III.II.B Le cycle de détyrosination / retyrosination .....	19
III.II.C La polyglutamylation .....	20
III.II.D La polyglycylation.....	21
III.II.E D'autres modifications post-traductionnelles.....	21
IV. Nucléation .....	22
IV.I Nucléation centrosomale .....	23
IV.II Nucléation non centrosomale.....	23
V. La dynamique microtubulaire .....	24
V.I L'instabilité dynamique .....	25
V.II Le treadmilling.....	26
VI. Régulation de la dynamique microtubulaire.....	27
VI.I Le polymorphisme et les modifications post-traductionnelles.....	27
VI.II Les MAPs (Microtubule Associated Proteins) .....	28
VI.II.A Les '+ end tracking proteins' .....	28
VI.II.B Les moteurs moléculaires .....	29
VI.II.D Les MAPs déstabilisatrices.....	33
VII. Le rôle des microtubules dans le trafic cellulaire .....	34
VII.I Dans la sécrétion protéique .....	34

VII.II Rab impliquées dans l'endocytose et abordées dans ce travail .....	37
Partie II : Les filaments d'actine .....	40
I. Structure et composition de l'actine .....	40
II. La dynamique des filaments d'actine .....	40
II.I La nucléation .....	41
II.II L'élongation .....	42
II.III Le désassemblage .....	42
II.IV Le recyclage .....	43
III. Organisation cellulaire des filaments d'actines .....	43
IV. Interrelations actine-microtubules .....	46
IV.I Les spectraplakines .....	47
IV.II. IQGAP1 .....	47
IV.III L'effet de l'interaction actine-MTs sur le trafic intracellulaire .....	48
IV.IV L'effet de l'interaction actine-MTs sur la cytotinèse .....	49
Partie III : Les septines .....	50
I. Propriétés générales des septines .....	50
I.I La découverte de la famille des septines .....	50
I.II Polymorphisme et localisation tissulaire .....	51
I.III Domaines fonctionnels .....	52
I.IV Polymérisation .....	54
I.IV.A Le modèle hexamère de (Sirajuddin et al., 2007) .....	55
I.IV.B Le modèle octamère de (Kim et al., 2011) .....	56
I.IV.C Repositionnement des septines : Le modèle de (Mendonça et al., 2019) et de (Soroor et al., 2020) .....	56
I.V L'association en des structures d'ordre supérieur .....	58
I.VI Régulation de l'association des septines en filaments et en structures d'ordre supérieur .....	59
I.VI.A Le GTP .....	59
I.VI.B La membrane plasmique et les phosphoinositides .....	60
I.VI.C Auto-régulation .....	61
I.VI.D Les protéines associées aux septines .....	62
I.VI.E Septines, actine et microtubules .....	62
I.VI.F La GTPase Cdc42 .....	64
II. Les fonctions des septines .....	68
II.I Les modes d'action au niveau moléculaire .....	68
II.I.A Barrière de diffusion .....	68
II.I.B Echafaudage protéique .....	71

II.II L'implication des septines dans différents processus cellulaires .....	72
II.II A La cytokinèse .....	72
II.II.B La régulation de la rigidité corticale.....	75
II.II.C Le trafic vésiculaire.....	76
II.II.D Stabilisation de protéines .....	76
II.II.E La migration cellulaire .....	76
II.III L'interrelation avec les autres membres du cytosquelette.....	77
II.III.A Septines et Actine .....	77
II.III.B Septines et Microtubules .....	79
III.    Septines et pathologies .....	83
III.I Les maladies neurodégénératives.....	83
III.II Infection virale/bactérienne.....	85
III.III Les cancers.....	87
III.II.A Implication de septines dans les cancers via leurs partenaires d'interactions.....	87
III.II.B Implication de certaines septines et de leurs isoformes dans les cancers .....	88
Partie IV : Les BORGs .....	90
I.    La découverte de la famille des BORG (Binder of Rho GTPase) / Cdc42EP/ CEP (Cdc42 effector proteins) .....	90
II.    La structure générale des BORG.....	91
II.I Le polymorphisme .....	91
II.II Les domaines fonctionnels .....	92
III.    Localisation tissulaire .....	94
IV.    La régulation des protéines BORG.....	94
IV.I Cdc42.....	94
IV.I.A Cdc42 constitutivement inactif.....	95
IV.I.B Cdc42 constitutivement actif.....	95
IV.II TC10/RhoQ et RhoA .....	97
IV.III PKC .....	97
IV.IV Les MAP kinases ERK2, ERK3 et MK5.....	97
IV.V HGF, TGF $\beta$ et SDF-1 $\alpha$ .....	98
IV.VI PUMILIO2 .....	98
V.    L'interactome des protéines BORG .....	98
V.I RhoA.....	98
V.II JNK.....	98
V.III Septines .....	99
V.IV Actine .....	99

VI.	Implication en physiologie et en physiopathologie.....	101
VI.I	Différenciation du trophoctoderme et du myoblaste.....	101
VI.II	Migration des cellules cancéreuses et métastases.....	101
VI.III	Angiogenèse.....	102
Partie V :	La chimiothérapie par les anticancéreux ciblant les microtubules .....	103
I.	Le site de liaison aux vinca-alcaloïdes .....	104
II.	Le site de liaison à la maytansine .....	105
III.	Le site de liaison à la colchicine .....	105
IV.	Le site de liaison aux Laulimalide et Peloruside A.....	106
V.	Le site de liaison au Pironetine .....	106
VI.	Le site de liaison aux Epothilones et aux Taxanes.....	106
VI.I	Les deux premiers taxanes identifiés : le paclitaxel et le docétaxel .....	107
VI.II	Les mécanismes d'action du paclitaxel .....	108
VI.II.A	Effet du paclitaxel sur la dynamique des MTs .....	108
VI.II.B	Effet du paclitaxel sur des voies de signalisation.....	109
VI.II.C	Effet du paclitaxel sur l'expression et la localisation de certaines protéines .....	110
VI.II.D	Effet du paclitaxel sur les autres membres du cytosquelette .....	110
VI.III	Les mécanismes de résistance au paclitaxel .....	112
VI.III.A	Efflux du paclitaxel en dehors la cellule.....	112
VI.III.B	Changements au niveau des MTs .....	112
VI.III.C	D'autres mécanismes .....	114
VI.IV	Les conséquences de la résistance au paclitaxel .....	115
	Présentation du premier volet du travail.....	116
	Présentation du deuxième volet du travail.....	132
	Présentation du troisième volet du travail.....	161
	Discussion générale et perspectives .....	189
	Bibliographie.....	209

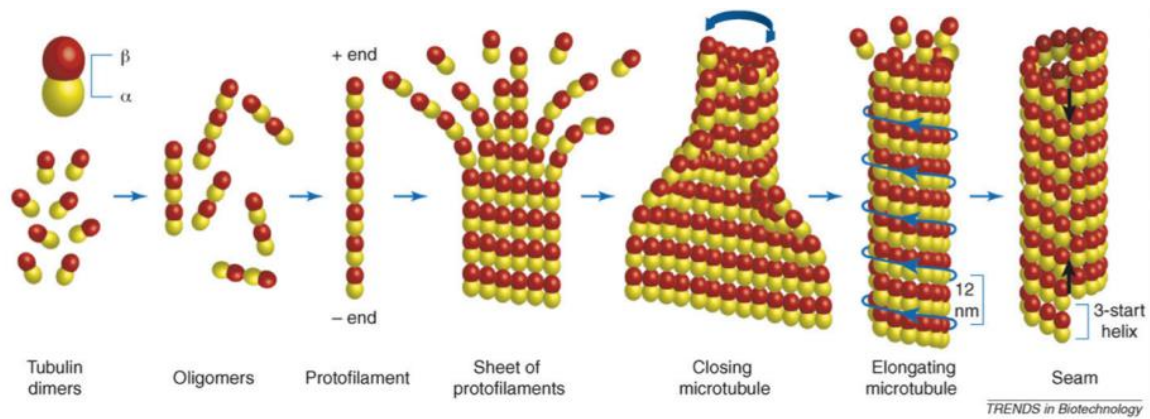
# Introduction générale

Le cytosquelette des cellules animales est constitué de trois éléments : Les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires (Pour revue : (Fletcher and Mullins, 2010)). Récemment, grâce à leur capacité à former des filaments et dû à leur association à l'actine et aux microtubules ainsi qu'à leurs effets sur ces deux éléments, les septines, sont considérées comme quatrième élément du cytosquelette (Mostowy and Cossart, 2012). La découverte et les propriétés de ce quatrième élément seront détaillées dans la partie III. Grâce à leurs capacités à répondre aux stimuli externes, à leur dynamisme et leurs réorganisations rapides, les éléments du cytosquelette sont impliqués dans une grande variété de fonctions cellulaires tels que le trafic intracellulaire, la division cellulaire, l'import intracellulaire, la motilité, l'adhérence ou la polarité. Dans cette thèse, on s'intéressera particulièrement aux septines et à l'interrelation entre les microtubules, les filaments d'actine et les septines.

## Partie I : Les Microtubules

### I. Structure et composition des microtubules

Les microtubules (MTs) sont composés d'hétérodimères de  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline chacun lié à un GTP (Guanosine TriPhosphate) qui s'auto-associent longitudinalement dans le même sens  $(\alpha\beta)_n$  pour former des protofilaments. Les protofilaments s'associent latéralement pour former un feuillet à deux dimensions qui se referme pour donner un cylindre creux d'environ 24nm de diamètre (Holmes and Choppin, 1968) (**Figure 1**). Le cylindre présente typiquement 13 protofilaments (Tilney et al., 1973). Les MTs sont des structures polarisées dont les deux extrémités sont distinctes, l'extrémité moins « - » qui expose l' $\alpha$ -tubuline et l'extrémité plus « + » qui expose la  $\beta$ -tubuline (Nogales et al., 1999). L'extrémité plus est appelée ainsi car c'est celle où l'incorporation de la tubuline est favorisée. A l'extrémité moins, à proximité d'un MTOC (MicroTubule Organizing Center), l'incorporation de tubuline est lente (Voter and Erickson, 1984) et c'est plutôt la perte de la tubuline qui est favorisée. Les MTOC sont définis comme des sites où les extrémités « - » des MTs sont ancrés et qui possèdent des fonctions comme la nucléation, la stabilisation et l'ancrage des MTs.



**Figure 1: Les différentes étapes de polymérisation des microtubules**

Les dimères de tubuline ( $\alpha$ -tubuline en jaune et  $\beta$ -tubuline en rouge) s'assemblent, formant des oligomères qui s'allongent en protofilaments. Ces derniers s'associent entre eux quand ils atteignent une longueur critique estimée de  $12 \pm 2$  dimères formant un feuillet à deux dimensions qui se referme pour donner un microtubule. Le microtubule se ferme à la couture (flèches noires), où il y a un point de discontinuité dans le réseau hélicoïdal.

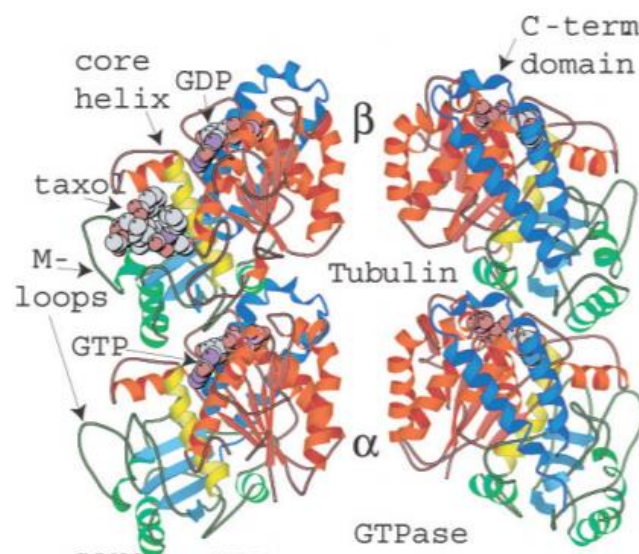
(Pampaloni and Florin, 2008)

## II. Principaux domaines fonctionnels de la tubuline et leurs fonctions

$\alpha$  et  $\beta$  tubulines sont des protéines d'environ 55 kDa chacune composées selon (Amos, 2004) de deux domaines globulaires de part et d'autre d'une hélice centrale H7 (**Figure 2 marqué en jaune**).

- Le domaine globulaire le plus large contient la partie N-terminale du polypeptide où se trouve la poche de liaison au GTP. Dans le dimère de tubuline, la sous-unité  $\alpha$  reste bloquée à l'état GTP (site de liaison dit non échangeable), tandis que la sous-unité  $\beta$  expose son site de liaison nucléotidique (dit échangeable), permettant le passage de l'état GDP à l'état GTP (avant polymérisation). Une fois incorporé dans un polymère, un dimère de tubuline active de façon légèrement retardée l'hydrolyse du GTP liée par la  $\beta$ -tubuline. Ceci conduit à un compactage longitudinal du protofilament qui permet ensuite secondairement un relâchement des interactions latérales avec les protofilaments voisins et la dépolymérisation des MTs (Alushin et al., 2014).
- Sur la  $\beta$ -tubuline se trouve le site de liaison du paclitaxel (Taxol®), une molécule stabilisatrice des MTs. Ce site est localisé sur la face de la  $\beta$ -tubuline exposée à l'intérieur du tube.

- La région C-terminale est formée par les hélices H11 et H12 impliquées dans la liaison des MAPs (Microtubule Associated Proteins) et des protéines motrices. L'hélice H12 et le domaine non structuré terminal des tubulines  $\alpha$ - et  $\beta$ - concentrent la majorité des modifications post-traductionnelles qui modulent la liaison des MAPs et des moteurs moléculaires aux MTs. De plus, la boucle reliant H11 et H12 est importante pour la polymérisation de nouveaux dimères dans le protofilament.



**Figure 2: Représentation du dimère de tubuline, extrait d'une figure de l'article (Amos, 2004)**

*La  $\beta$ -tubuline et l' $\alpha$ -tubuline sont représentées de deux points de vue différents à gauche et à droite. Les feuillets  $\beta$  sont colorés en rose et bleu clair. L'hélice H7 est colorée en jaune et le domaine C-terminal est coloré en bleu.*

### III. Polymorphisme

Les séquences qui codent l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline ont été hautement conservées pendant l'évolution. Malgré cela, l'hétérogénéité de la tubuline est générée de deux façons : 1) par l'expression de différents isotypes et 2) par des modifications post-traductionnelles.

#### III.I Les différents isotypes de tubuline

Il existe différents gènes qui codent pour l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline dont l'expression génère des différences dans les séquences en acides aminés surtout au niveau de la région C-terminale (Ludueña and Banerjee, 2008). Chez les humains, 8 isotypes d' $\alpha$ -tubuline et 7 isotypes de  $\beta$ -



tubuline (Ludueña, 2013) codés par différents gènes à expressions tissulaires variées peuvent constituer les hétérodimères des MTs (Verdier-Pinard et al., 2009). Le fonctionnement des MTs est indépendant de leurs compositions en isotypes sauf pour les MTs hautement spécialisés tels que ceux rencontrés par exemple dans les axonèmes ciliaires, pour qui le fonctionnement dépend de certains isotypes de  $\beta$ -tubuline (Renthal et al., 1993) ; (Jensen-Smith et al., 2003).

### III. II Les modifications post-traductionnelles

#### III.II.A L'acétylation

L'acétylation est une modification post-traductionnelle enrichie sur les MTs stables (Szyk et al., 2014) et donc rencontrée essentiellement dans les polymères (Perdiz et al., 2011). Le site d'acétylation le mieux connu est dans la partie N-terminale de l' $\alpha$ -tubuline sur la Lysine 40 (L'Hernault and Rosenbaum, 1985) (**Figure 3**). Cette dernière se trouve dans la lumière du MT (Soppina et al., 2012). D'autres sites d'acétylation sur  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline ont été découverts mais sont soit pas encore confirmés (Choudhary et al., 2009; Liu et al., 2015) soit responsables d'un défaut d'incorporation de la tubuline dans les MTs comme avec la lysine K252 de la  $\beta$ -tubuline (Chu et al., 2011). L'enzyme responsable de l'acétylation de la K40 est l'acétyl-transférase MEC-17 (Akella et al., 2010) aussi connue sous le nom de  $\alpha$ -Tat1 ( $\alpha$ -tubuline acétyltransférase 1). La désacétylation est exécutée par deux enzymes : HDAC6 (Histone deacetylase 6) (Hubbert et al., 2002) et Sirt2 (Sirtuin 2) (North et al., 2003). Les dimères de tubulines sont rapidement désacétylés après relargage du MT (Perdiz et al., 2011).

#### III.II.B Le cycle de détyrosination / retyrosination

Les  $\alpha$ -tubulines de la majorité des espèces présentent un résidu tyrosine C-terminal (Valenzuela et al., 1981) qui peut être enzymatiquement enlevé (Hallak et al., 1977) ou ré-incorporé (Arce et al., 1975) (**Figure 3**). Le complexe vasohibine/SVBP a été récemment identifié comme la carboxypeptidase qui catalyse la détyrosination des  $\alpha$ -tubulines (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017), tandis que l'enzyme responsable de la tyrosination est la Tubulin Tyrosine Ligase (TTL) (Raybin and Flavin, 1975). La détyrosination a lieu au niveau du MT (Hallak et al., 1977) et le stabilise en le protégeant de la dépolymérisation par les membres de la famille de kinésine 13 tel que KIF2C/MCAK (Peris et al., 2009 ; Sirajuddin et al., 2014) et en renforçant la présence de protéines qui favorisent le maintien du polymère comme CLIP-

170 qui interagit spécifiquement avec les MTs tyrosinés (Peris et al., 2006). La retyrosination a lieu au niveau des dimères de tubuline soluble (Raybin and Flavin, 1975 ; Prota et al., 2013) interférant ainsi avec son incorporation dans le polymère. Il a été montré que la surexpression de TTL inhibe la polymérisation des MTs *in vitro* (Szyk et al., 2011).

### III.II.C La polyglutamylation

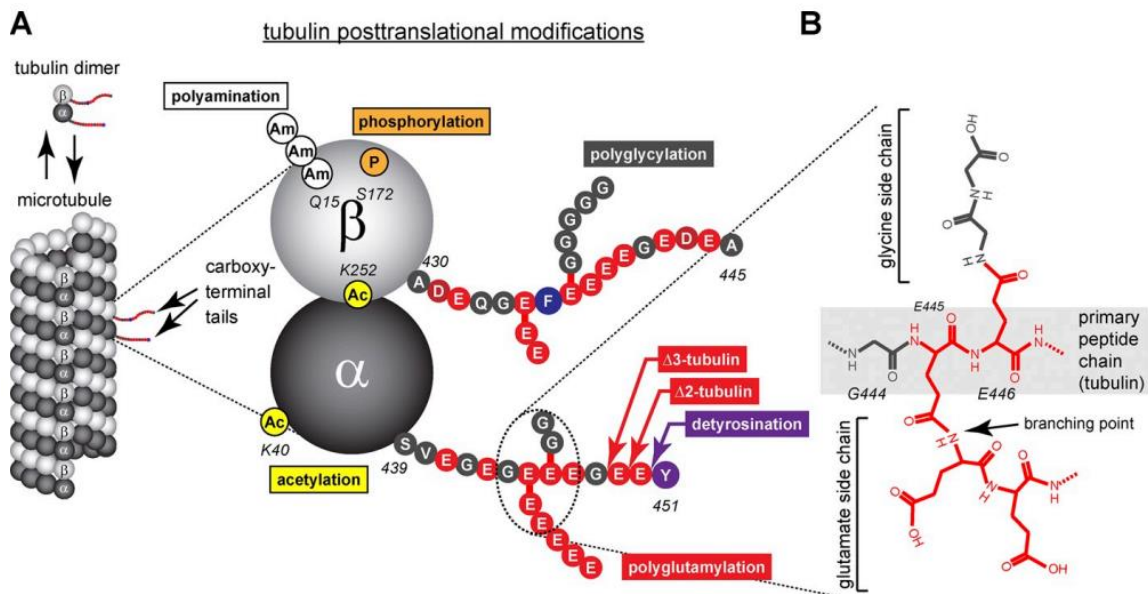
La polyglutamylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en la formation des chaînes latérales secondaires de glutamate sur des résidus de glutamate codés génétiquement dans la partie C-terminale d' $\alpha$ - ou de  $\beta$ - tubuline (Edde et al., 1990 ; Alexander et al., 1991) (**Figure 3**). Les enzymes responsables de cette modification appartiennent à la famille des TTL like (Tubulin Tyrosin Ligase Like) (Regnard, 2003 ; Janke, 2005). Chez les mammifères, il existe 9 glutamylases ayant des préférences soit pour  $\alpha$ - ou pour  $\beta$ - tubuline (van Dijk et al., 2007). Certaines glutamylases (TTLL4, 5 et 7) initient la polyglutamylation en ajoutant un premier résidu glutamate à la tubuline alors que d'autres TTLL telles que TTLL 1, 6, 11 et 13 rajoutent au premier glutamate d'autres résidus et donc allongent la chaîne (Janke and Bulinski, 2011). Les déglutamylases sont des enzymes qui suppriment la polyglutamylation et appartiennent à la famille des carboxypeptidases cytosoliques (CCP) (Kimura et al., 2010). La surexpression des glutamylases a été identifiée dans différents types de cancers : TTLL1, TTLL11, TTLL5 et TTLL4 dans des cas de cancers du sein (Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Arnold et al., 2020) ainsi que TTLL4 dans les adénocarcinomes canauxaires pancréatiques (Kashiwaya et al., 2010) et sont corrélés à l'agressivité des tumeurs. La polyglutamylation influence l'interaction des MTs avec les protéines associées (MAP). Dans un cas de résistance au paclitaxel, un agent anticancéreux stabilisateur des MTs utilisé en chimiothérapie, une augmentation de la polyglutamylation des MTs accentue le recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 et la kinésine dépolymérisante MCAK contrecarrant ainsi l'effet stabilisateur du paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2015; Targa et al., 2019). De plus, la surexpression de TTLL6 mène au recrutement de la MAP spastine sur les MTs favorisant ainsi leur dépolymérisation (Lacroix et al., 2010). Un excès de polyglutamylation nuit au transport de cargaisons sur les MTs dans les neurones de l'hippocampe (Magiera et al., 2018). Ainsi, cette modification post-traductionnelle affecte la dynamique des MTs ainsi que leur rôle dans le trafic intracellulaire.

### III.II.D La polyglycylation

Comme pour la polyglutamylolation, la polyglycylation est une modification post traductionnelle qui génère des chaînes latérales de glycine au niveau de l'extrémité C-terminale des  $\alpha$ - et  $\beta$ - tubulines (**Figure 3**). Contrairement à la polyglutamylolation, la glycylation est restreinte au niveau des cils et flagelles. Les enzymes responsables de cette modification appartiennent aussi à la famille des TTL. TTL3 et 8 sont des glycylasses initiatrices alors que TTL10 est une glycylassse élongatrice (Wloga et al., 2009 ; Rogowski et al., 2009). L'effet de la glycylation sur les MTs n'est pas bien connu, mais après des études de déplétion de glycylasses, il semble que la glycylation joue un rôle dans la stabilisation des MTs axonémaux (Rogowski et al., 2009; Bosch Grau et al., 2017).

### III.II.E D'autres modifications post-traductionnelles

La **phosphorylation** la mieux étudiée a lieu au niveau de la sérine S172 de  $\beta$ -tubuline catalysée par Cdk1 et qui pourrait réguler la dynamique des MTs durant la division cellulaire (Fourest-Lieuvin et al., 2006 ; Caudron et al., 2010). La **polyamination** a été découverte sur les tubulines de cerveau (Song et al., 2013). Elle a lieu sur différents résidus glutamines d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline et est catalysée par des transglutaminases. Cette modification contribue à la stabilisation des MTs (Song et al., 2013) (**Figure 3**). La **palmitoylation** (Caron, 1997), l'**ubiquitination** (Ren et al., 2003), l'**arginylation** (Wong et al., 2007), la **méthylation** (Xiao et al., 2010), et la **sumoylation** (Rosas-Acosta et al., 2005) font partie des modifications post-traductionnelles trouvées sur la tubuline mais peu d'études ont été menées à leur sujet.



**Figure 3: Schéma représentant les différentes modifications post-traductionnelles de la tubuline**

**A.** Les modifications post-traductionnelles sont : l'acétylation (AC) au niveau de Lysine 40 (K40), la phosphorylation (P) au niveau de la sérine 172 (S172), la polyamination (Am) au niveau de la glutamine 15 (Q15), la polyglutamylation (E) et la polyglycylation (G). Les sites de modifications de la polyglutamylation et polyglycylation ont été choisis au hasard.

**B.** Structure chimique de peptides branchés suite à la polyglutamylation et la polyglycylation.

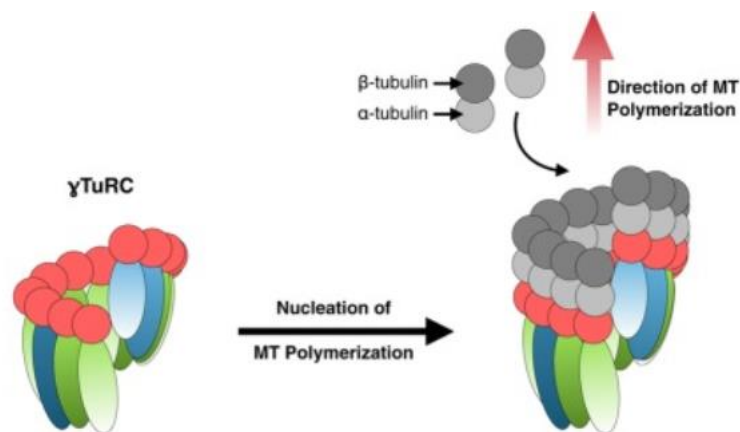
(Janke, 2014)

#### IV. Nucléation

L'assemblage des MTs par auto-nucléation a lieu *in vitro* quand les concentrations des hétérodimères d' $\alpha/\beta$ -tubuline varient entre 20 et 40 $\mu$ M (Hyman and Karsenti, 1998). Cependant, dans les cellules, l'assemblage des MTs nécessite un facteur de nucléation pour initier la polymérisation. Les MTs sont nucléées au niveau d'un centre d'organisation de MTs (MTOC= Microtubule Organization Center) qui est généralement le centrosome. Les MTs peuvent se dissocier du centrosome pour être transportés par des moteurs moléculaires à différents endroits dans la cellule (Sharp and Ross, 2012), mais dans de nombreuses cellules différenciées, des MTs sont aussi assemblés par des MTOC non centrosomaux comme l'appareil de Golgi (Doxsey, 2001; Vinogradova et al., 2009 ; Sanchez and Feldman, 2017).

## IV.I Nucléation centrosomale

Le MTOC le plus étudié est le centrosome, un organe composé de deux centrioles entourés par du matériel péri-centriolaire (PCM). Le facteur de nucléation est un complexe de protéines formé de  $\gamma$ -tubuline et différentes protéines associées. Parmi ces différentes protéines, la famille de polymérase de MT XMAP215/Msps/Stu2/Dis1/Alp14/ZYG-9/ch-TOG/MOR1 récemment détectée (Thawani et al., 2018; Flor-Parra et al., 2018). Chez les eucaryotes, ce complexe est appelé le complexe  $\gamma$ -TuRC pour «  $\gamma$ -Tubulin Ring Complex » nommé ainsi pour son aspect détecté par microscopie électronique (Zheng et al., 1995).  $\gamma$ -TuRC se lie à l' $\alpha$ -tubuline de l'extrémité «-» du MT (Wu and Akhmanova, 2017).



**Figure 4: Nucléation de l'assemblage des microtubules par  $\gamma$ -TuRC**

*$\gamma$ -TuRC* consiste d'un ensemble de protéines : les GCP ( *$\gamma$ -TRUC complex proteins*) représentées en vert clair, vert foncé et bleu qui se lient entre elles et à la  $\gamma$ -tubuline représentée en rouge formant un complexe dans lequel un anneau de  $\gamma$ -tubuline mime l'extrémité « + » du microtubule.

(Oakley et al., 2015)

## IV.II Nucléation non centrosomale

Les MTOC non centrosomaux (ncMTOC) sont des sites alternatifs d'organisation des MTs dans différents types cellulaires différenciés, mais leur composition et leur ancrage dans différents sites subcellulaires reste peu connus. Un MTOC périnucléaire ancré à la surface du noyau a été récemment étudié. Il recrute des polymérases de MTs et initie la formation de MTs indépendamment de  $\gamma$ -tubuline (Zheng et al., 2020). Les MTs peuvent aussi être générés à partir du Golgi (Chabin-Brion et al., 2001 ; Efimov et al., 2007). Au niveau du cis-Golgi, le MTOC est formé par la protéine d'ancrage AKAP450 (Rivero et al., 2009) recrutée par la protéine GM130 (Hurtado et al., 2011). La protéine AKAP450 à son tour recrute  $\gamma$ -TuRC (Rivero et al.,

2009) et CDK5RAP2, protéine activatrice de  $\gamma$ -TuRC (Wang et al., 2010). Au niveau du trans-Golgi, le MTOC est formé par des protéines CLASP (suivant l'extrémité + en croissance des MTs) qui sont recrutées par la protéine GCC185 du Golgi (Miller et al., 2009; Sato et al., 2014).

Les chromosomes en mitose induisent l'assemblage des MTs dans une région proche de leur kinétochores. En fait la chromatine seule, dépourvue de kinétochores peut induire l'assemblage des MTs (Revue : Meunier and Vernos, 2016). La chromatine active la voie Ran-GTP en recrutant RCC1, une GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) associée à Ran. Ran promeut l'interaction de TPX2 (Targeting Protein for Xklp2) avec un complexe de nucléation de MTs (Scrofani et al., 2015).

Les MTs peuvent aussi naître à partir de MTs préexistants grâce au complexe octamérique augmine aussi nommée HAUS (Homologous to AUgmin Subunits) (Goshima et al., 2008) qui recrute  $\gamma$ -TURC à la lattice (Kamasaki et al., 2013). Il s'avère que le complexe augmine interagit aussi avec la voie Ran-GTP (Petry et al., 2013). Récemment, SSNA1, une protéine de liaison aux MTs a été démontré *in vitro* comme protéine induisant la nucléation de nouveaux MTs à partir de MTs préexistants (Basnet et al., 2018).

## V. La dynamique microtubulaire

Les MTs sont très dynamiques car ils alternent entre des phases d'élongations et de raccourcissement. L'incorporation des dimères dans les protofilaments dépend de l'état nucléotidique de la tubuline (Carlier, 1982). Cet état représente spécifiquement l'état nucléotidique de la  $\beta$ -tubuline. En effet l' $\alpha$ -tubuline lie le GTP dans un site non-échangeable alors que  $\beta$ -tubuline est la seule capable d'hydrolyser le GTP en GDP+Pi qui peut alors être échangé contre une nouvelle molécule de GTP (site échangeable). Le dimère associé au GTP possède une conformation courbée qui a été présentée comme compatible avec son incorporation sous la forme de feuillets courbés à l'extrémité en croissance (Brouhard and Rice, 2014). L'association de ce dimère au protofilament le rend linéaire (Rice et al., 2008) (**Figure 5a**). Après polymérisation, l'hydrolyse du GTP a lieu, le phosphate n'est pas libéré mais le dimère lié à GDP-Pi possède une courbure favorisant ainsi la dépolymérisation des protofilaments (**Figure 5b**). Ainsi, la transition entre la conformation courbée et linéaire des hétérodimères de tubulines est importante pour la régulation de la dynamique microtubulaire.

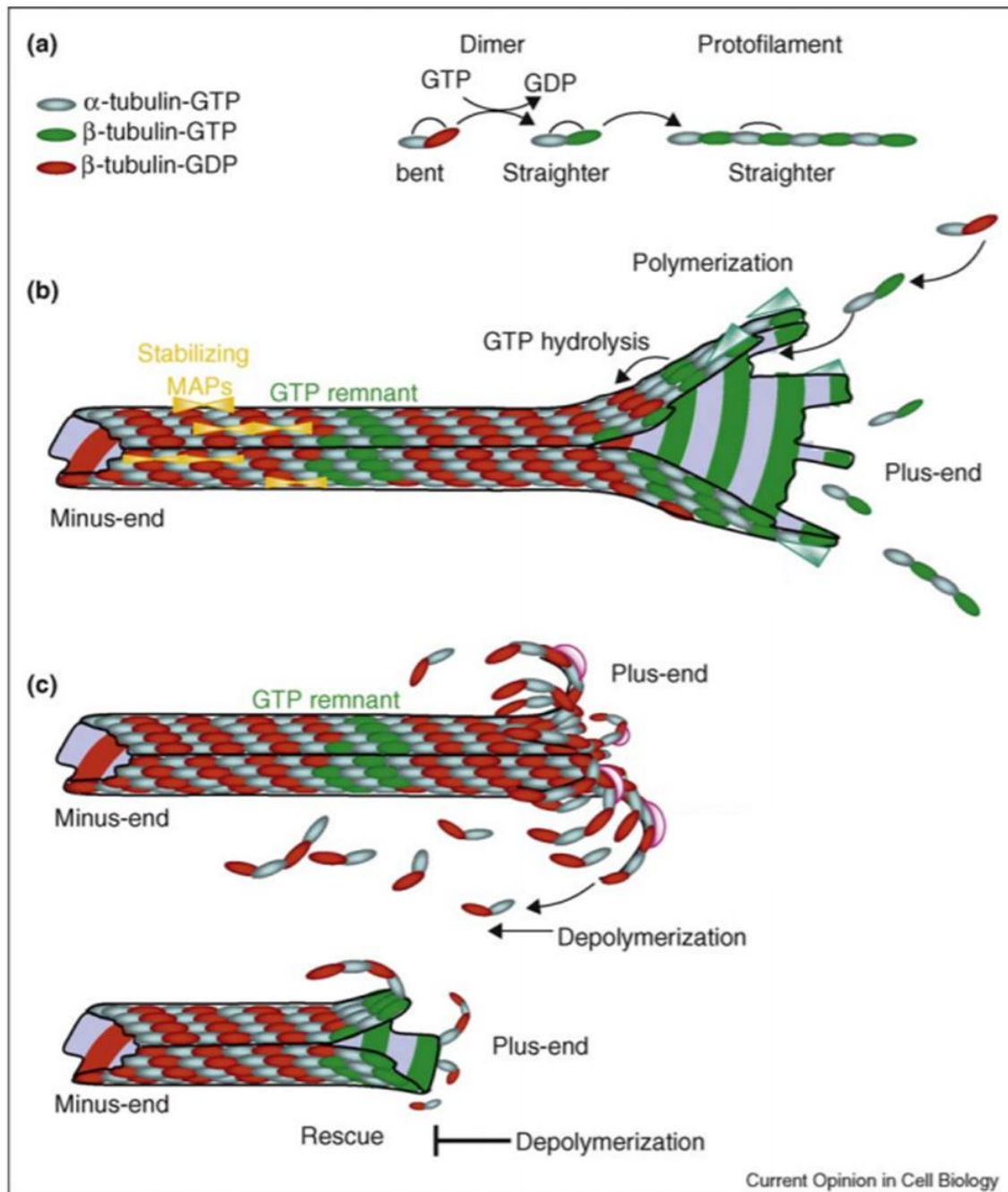
## V.1 L'instabilité dynamique

L'accumulation de dimères liant le GTP à l'extrémité « + » du MT forme une coiffe stabilisante (Jánosi et al., 2002) (**Figure 5b**). Quand la coiffe est perdue, le MT se dépolymérise rapidement, cet évènement est appelé catastrophe (**Figure 5c**). Un MT en dépolymérisation peut être sauvé et repolymérise de nouveau (**Figure 5d**). Cette capacité d'alterner entre polymérisation et dépolymérisation est connue sous le nom d'instabilité dynamique. Grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la conformation de la tubuline liant le GTP (Dimitrov et al., 2008), des régions discrètes ont été identifiées le long du MT et nommées 'GTP remnants' ou îlots GTP. Ils sont considérés des points de sauvetage (**Figure 5c**) et correspondent à des régions au niveau desquelles on rencontre des défauts architecturaux et/ou des réparations de la paroi microtubulaire (Dimitrov et al., 2008 ; de Forges et al., 2016; Aumeier et al., 2016).

Des études *in vitro* montrent que des MTs plus « âgés », en croissance pour une longue période de temps sont plus susceptibles de subir des catastrophes (Odde et al., 1995). Les évènements qui induisent ces catastrophes ne sont pas encore bien connus, mais il se peut que l'accumulation de défauts au niveau du MT soit impliquée. Dans les cellules, le phénomène de catastrophe peut être induit par des obstacles tel que le cortex cellulaire qui exerce des forces sur l'extrémité en croissance des MTs (Janson et al., 2003) ou les adhérences focales (Efimov et al., 2008). Il en va de même pour les sauvetages qui se produisent préférentiellement au niveau de patches corticaux d'Adenomatous Polyposis Coli (APC) (Reilein and Nelson, 2005) ou aux croisements microtubulaires (de Forges et al., 2016).

*In vitro*, les deux extrémités des MTs sont capables de polymériser et de présenter une coiffe GTP, cependant les propriétés dynamiques des deux extrémités sont très différentes. L'extrémité « - » polymérise plus lentement et subit des catastrophes moins fréquemment que l'extrémité « + ». De plus, quand la coiffe est perdue, l'extrémité « + » dépolymérise alors que l'extrémité « - » reste relativement stable et continue la croissance (Walker et al., 1989), (Tran et al., 1997).





**Figure 5: Schéma représentant l'instabilité dynamique des microtubules**

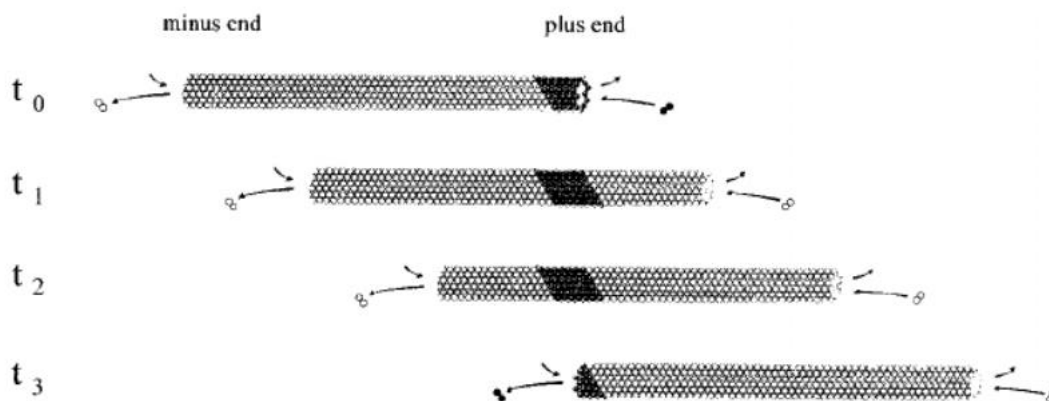
(Etienne-Manneville, 2010)

## V.II Le treadmilling

Le phénomène de « treadmilling » ou tapis roulant a été initialement découvert *in vitro* par (Margolis and Wilson, 1981) en observant des MTs exposés à du GTP marqué. Cette observation montre que les MTs sont capables d'intégrer au niveau de leur extrémité « + » des dimères de tubuline et en même temps perdre au niveau de leur extrémité « - » d'autres



dimères. Il a lieu quand la vitesse de polymérisation de l'extrémité « + » est proche de la vitesse de dépolymérisation de l'extrémité « - » (**Figure 6**).



**Figure 6: Schéma représentant le « treadmilling » des MTs in vitro**

Les dimères colorés en gris foncé représentent un segment marqué du MT. On observe la localisation de ce segment à différents temps le long du corps du MT.

(Margolis and Wilson, 1998)

Ce phénomène a été aussi observé in vivo dans des mélanophores de poisson (Rodionov and Borisy, 1997), des cellules épithéliales de rat-kangourou (Keating et al., 1997) et de triton (Waterman-Storer and Salmon, 1997), après libération des MTs par le centrosome.

Dans les cellules en mitose, le treadmilling des MTs du fuseau occupe une place importante pendant la métaphase (Wadsworth and Salmon, 1986) et pourrait expliquer le flux polaire de tubuline observé (Mitchison, 1989). Ce treadmilling est aussi une cible importante des traitements anti-mitotiques ciblant la tubuline (Jordan and Wilson, 2004).

## VI. Régulation de la dynamique microtubulaire

### VI.I Le polymorphisme et les modifications post-traductionnelles

Les différents isotypes de tubulines possèdent des propriétés dynamiques différentes contribuant à la stabilité ou l'instabilité des MTs (propriétés décrites dans la partie V de la thèse). De plus, les modifications post-traductionnelles affectent aussi cette dynamique en régulant le recrutement des MAPs aux MTs (rôles détaillés dans la partie polymorphisme de ce chapitre).

## VI.II Les MAPs (Microtubule Associated Proteins)

L'organisation des MTs dans les cellules est étroitement régulée par un grand nombre de MAPs qui favorisent la polymérisation ou la dépolymérisation des MTs. Ces protéines sont regroupées en plusieurs catégories :

### VI.II.A Les '+ end tracking proteins'

Les protéines suivant l'extrémité « + » ou +TIPs (+ end tracking proteins) forment un groupe de protéines structurellement et fonctionnellement diverses qui se distinguent par leur accumulation spécifique aux extrémités « + » des MTs (van der Vaart et al., 2013). Elles influencent non seulement la dynamique des MTs mais aussi leur nucléation comme par exemple le cas de la +TIP CLASP mentionnée dans le paragraphe IV.II de ce chapitre. Parmi les différentes +TIPs se trouvent :

Les protéines de la famille des End-Binding (EB) qui sont trois chez les mammifères EB1, EB2 et EB3 (Su and Qi, 2001), sont des protéines fondamentales dans le recrutement d'autres +TIPs aux MTs. Les homo/hétérodimères de protéines EB interagissent et reconnaissent les bouts « + » des MTs via leur domaine CH (Calponin Homology Domain) (Hayashi and Ikura, 2003 ; Song et al., 2020). Ils possèdent au niveau de leur domaine coiled-coil, le motif conservé EBH (EB Homology) qui interagit avec les motifs SxIP (Honnappa et al., 2009). L'extrémité C-terminale des protéines EB présente un tripeptide EEY identique à celui porté par l' $\alpha$ -tubuline et par une autre +TIP appelée CLIP-170. Ce tripeptide est le ligand des domaines CAP-Gly (cytoskeleton-associated protein glycine-rich) trouvés sur d'autres +TIPs comme CLIP-170 ou la sous-unité p150<sup>Glued</sup> de la dynactine (Mishima et al., 2007 ; Weisbrich et al., 2007).

Le rôle de EB1 dans la régulation de la dynamique des MTs varie selon qu'il s'agit d'études *in vitro* ou *in cellulo* puisque, au niveau des cellules, son rôle dépend aussi de tout son interactome. *In vitro*, il participe à la nucléation des MTs et à l'induction de catastrophes et occasionnellement des sauvetages (Vitre et al., 2008). Dans d'autres études, les protéines EB ont induit plutôt des catastrophes en se liant à la coiffe et en accélérant l'hydrolyse du GTP lié aux dimères de tubuline (Maurer et al., 2011). Une étude récente montre sa contribution avec d'autres MAPs à l'induction du treadmilling aux bouts « + » (Arpağ et al., 2020). Cependant, dans les cellules, EB1 promeut la croissance continue des MTs, du centre nucléateur à la

périphérie (Kita et al., 2006 ; Zanic et al., 2013) et joue un rôle dans la suppression des catastrophes (Komarova et al., 2009).

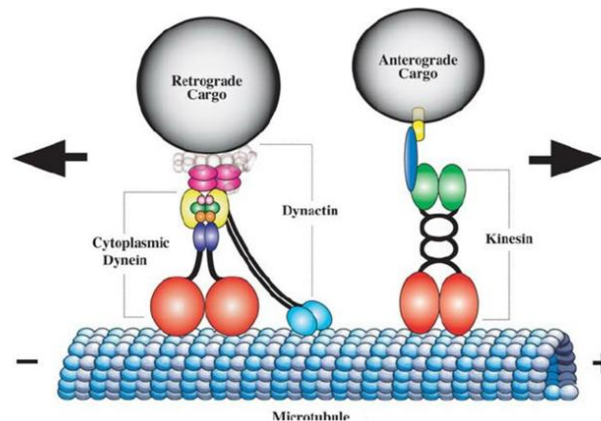
CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein-170) est la première +TIPs à être identifiée (Perez et al., 1999). Dans son domaine H1 (Head domain), elle contient 2 motifs CAP-Gly ainsi que des motifs SxIP (Chen et al., 2019) ce qui permet à cette protéine de se lier aux MTs par interaction avec l' $\alpha$ -tubuline et EB (Mishima et al., 2007 ; Dixit et al., 2009 ; Chen et al., 2019). CLIP-170 est facteur de sauvetage *in vitro* (Diamantopoulos et al., 1999 ; Arnal et al., 2004) et *in vivo* puisqu'une inhibition de CLIP-170 et de son paralogue CLIP-115 élimine les événements de sauvetage (Komarova et al., 2002). Le rôle de facteur sauvetage de CLIP-170 peut provenir uniquement de lui-même (Arnal et al., 2004 ; Henrie et al., 2020) ou bien de ses protéines partenaires (Komarova et al., 2002). En effet, CLIP-170 et son partenaire CLASP qui lui aussi promeut des événements de sauvetage (Al-Bassam et al., 2010) en recrutant les dimères de tubuline, reconnaissent des ilots de GTP qui sont des sites de sauvetages (de Forges et al., 2016). Un autre partenaire de CLIP-170, p150<sup>Glued</sup> (Watson, 2006), une sous-unité de la dynactine nécessaire pour le fonctionnement du moteur moléculaire dynéine sur les MTs, est inhibitrice des catastrophes (Komarova et al., 2002 ; Lazarus et al., 2013). IQGAP1, un effecteur des Rho GTPases Cdc42 et Rac1 interagit avec CLIP-170. Cdc42 et Rac1 actifs marquent des zones du cortex où se met le complexe formé par CLIP-170 et IQGAP1 entraînant la polarisation des MTs et la polarisation de la cellule (Fukata et al., 2002).

MCAK est membre de la famille des kinésines 13 aussi appelée KIF2C (Lawrence et al., 2004). Cette famille de kinésine ne déplace pas de cargaison le long des MTs mais utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour induire une conformation courbée des protofilaments qui facilite la dépolymérisation (Desai et al., 1999). MCAK diffuse vers les extrémités « + » des MTs (Helenius et al., 2006) mais possède aussi des motifs SxIP ce qui lui permet aussi d'être recrutée au bout « + » des MTs par le biais d'une autre protéine TIP150 et par EB1 (Jiang et al., 2009).

### VI.II.B Les moteurs moléculaires

Les MTs assurent une variété de mouvements à l'intérieur de la cellule tels que le transport intracellulaire, le positionnement des vésicules membranaires et la séparation des chromosomes durant la mitose. Le mouvement le long des MTs est basé sur l'action de

protéines motrices qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour produire de la force et du mouvement. Les deux familles des moteurs moléculaires qui évoluent sur les MTs sont les kinésines et les dynéines. La plupart des membres de la famille des kinésines se déplacent vers l'extrémité « + » du MT, mais certains se déplacent vers l'extrémité « - » (Hanlon et al., 1997). Les dynéines se déplacent vers l'extrémité « - » du MT. Le déplacement effectué par les kinésines est souvent appelé antérograde alors que celui des dynéines est appelé rétrograde.



**Figure 7: Dynéine et kinésine, les moteurs moléculaires des MTs**

*Diagramme schématique des moteurs microtubulaires cytoplasmiques : les dynéines et les kinésines.*

*Flèches noires : Direction de transport des cargos par les moteurs moléculaires.*

*Schéma de la dynéine cytoplasmique : Rouge : chaînes lourdes ; Jaune : chaînes intermédiaires, Indigo : chaînes légères intermédiaires, Rose claire, vert et orange : chaînes légères ; Turquoise : La sous-unité la plus large de la dynactine, un complexe protéique de taille comparable à la dynéine, p150Glued ; Rose foncé : sous-unité p50 de la dynactine*

*Schéma de la kinésine conventionnelle : Rouge : Chaînes lourdes ; Vert : Chaîne légères médient la liaison au cargo via une protéine intermédiaire (bleue) qui se lie à une protéine transmembranaire du cargo (jaune)*

(Duncan and Goldstein, 2006)

Chez les mammifères, 45 kinésines ont été identifiées et classées en 14 groupes (Miki et al., 2001). Les kinésines sont formées d'une à 4 chaînes lourdes contenant le domaine ATPase et permettant à la protéine de se lier aux MTs. La kinésine conventionnelle (Kinésine 1 ou KIF5) est formée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (**Figure 7**, marquées en rouge et vert respectivement). Les kinésines peuvent lier directement ou indirectement les cargaisons.

Les dynéines sont divisées en deux catégories : 1) cytoplasmiques exprimées dans la majorité des cellules et 2) axonémales. La dynéine cytoplasmique est formée de deux chaînes lourdes liant les MTs ayant chacune 6 domaines ATPase (**Figure 7**, marquées en rouge) ainsi que

plusieurs chaînes intermédiaires, intermédiaires légères et légères (**Figure 7**, marquées en jaune, rose clair, vert, orange et indigo). La dynactine est un grand complexe protéique qui permet la liaison de dynéine à sa cargaison ou bien de renforcer cette liaison. La plus grande sous-unité de la dynactine est p150<sup>Glued</sup> qui interagit avec la dynactine au niveau des chaînes intermédiaires et avec les MTs par leurs motifs CAP-Gly (**Figure 7**, marqué en turquoise). Une autre sous-unité de dynactine est p50 qui lie p150<sup>Glued</sup> au cargo (**Figure 7**, marqué en rose) (Duncan and Goldstein, 2006). La dynactine accroît le déplacement processif de la dynéine sur les MTs, c'est-à-dire sa capacité à faire de nombreux pas consécutifs sans se décrocher (King and Schroer, 2000).

La famille des kinésines 4, 5, 8, 13 et 14 régulent la dynamique des MTs en agissant sur les extrémités « + » des MTs (Hunter et al., 2003 ; Sproul et al., 2005 ; Gupta et al., 2006 ; Gardner et al., 2008 ; Bieling et al., 2010). Les membres de la famille des kinésines 8 se déplacent vers le bout « + » des MTs. Elles forment un gradient tout au long des MTs et se concentrent majoritairement au niveau des bouts « + » et exercent leurs rôles de kinésines dépolymérisantes (Fukuda et al., 2014). Ce mode d'action a bien été décrit chez la levure : la forte liaison de la kinésine aux dimères de tubulines présentant une courbure stabilise leur forme, favorisant ainsi la dépolymérisation (Arellano-Santoyo et al., 2017). Les membres de la famille des kinésines 14 ont un effet dépolymérisant moins importants que les autres kinésines citées. En effet, Kar3, la kinésine 14 de la levure se lie via une sous-unité non catalytique Cik1 qui joue le rôle d'intermédiaire à la liaison de la kinésine aux bouts « + » (Chu et al., 2005). En tirant Cik1 vers l'extrémité « - », Kar3 induit une légère dépolymérisation (Sproul et al., 2005).

Il a été démontré par (Laan et al., 2012) dans un système *in vitro* où la dynéine est immobilisée sur des obstacles que ce moteur est capable d'ancrer les bouts « + » des MTs aux obstacles en question, d'inhiber leur croissance et d'induire leur catastrophe. Dans le même sens, une autre étude montre que l'absence de la dynéine diminue la fréquence de catastrophe des MTs astraux ce qui mène à des MTs plus longs (Estrem et al., 2017). Cependant, il a aussi été proposé que la présence de dynéine sur les bouts « + » des MTs neuronaux les stabilisent, rendant le transport rétrograde fonctionnel (Yogev et al., 2017).

En dehors de ces exemples, la plupart des moteurs microtubulaires n'ont pas un rôle direct dans la régulation de la dynamique des MTs à l'extrémité « + » mais agissent plutôt sur la

dynamique des MTs via les cargaisons qu'ils transportent. Par exemple, la kinésine conventionnelle KIF5B transporte des MAP kinases de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase ; (Verhey et al., 2001)), régulant ainsi la dynamique des MTs (Daire et al., 2009). Dans ce cas, JNK augmente la fréquence des sauvetages en phosphorylant CLIP-170 (Henrie et al., 2020).

### VI.II.C Les MAPs stabilisatrices

La régulation de la dynamique des MTs se fait également par plusieurs protéines associées aux MTs tels que les protéines stabilisatrices Tau (Revue : (Bodakuntla et al., 2019)) ou MAP2 (Gamblin et al., 1996) plutôt impliquées dans la régulation des MTs neuronaux. D'autres MAPs jouent un rôle important dans la régulation de la dynamique des MTs dans les cellules épithéliales. Ces MAPs comme les MAPs neuronales sont le plus souvent régulées par des phosphorylations/déphosphorylations qui contrôlent leur liaison aux MTs ou leur capacité à les stabiliser.

#### *MAP4*

La protéine MAP4 aussi connue sous le nom de MAP3 est exprimée dans une variété de types cellulaires (revue : (Honore et al., 2005)) où elle favorise l'assemblage des MTs (Nguyen et al., 1997) ainsi que la liaison des MTs à l'actine (Matsushima et al., 2012). Le rôle stabilisateur de MAP4 est inhibé par son interaction avec SEPT2 ou l'hétérodimère SEPT6/7 l'empêchant de se lier aux MTs (Kremer et al., 2005). MAP4 est également inhibé par p53 ce qui constitue un mécanisme de résistance aux taxanes (Hait and Yang, 2006). L'effet stabilisateur de MAP4 peut être contrecarré par des kinases telles que le complexe CyclineB-p34Cdc2/CDK1 qui phosphoryle MAP4 sur les MTs sans provoquer son détachement (Ookata et al., 1995) ou par la kinase MARK4 (MAP/Microtubule affinity-regulating kinase 4) appartenant une famille des sérine/thréonine kinases aussi appelée Par (partitioning-defective) impliquées dans le contrôle de la polarité cellulaire et qui provoquent le détachement des MAPs des MTs après phosphorylation (Naz et al., 2013). Il a été proposé que pour augmenter la sensibilité des cancers des ovaires au paclitaxel, il faut inhiber la phosphorylation de MAP4 (Yang et al., 2018).

### *MAP7/E-MAP115/Enconsin*

La protéine MAP7 ou E-MAP115 (MAP épithéliale de 115kDa) est majoritairement exprimée dans les cellules épithéliales (Masson and Kreis, 1993). MAP7 s'associe avec les MTs en interphase, mais affecte n'affecte les MTs qu'en division cellulaire où elle favorise leur polymérisation (Faire et al., 1999 ; Gallaud et al., 2014). Des études dans les cellules musculaires et dans les ovocytes de drosophile montrent que MAP7 influe sur le trafic intracellulaire en favorisant l'association de kinesine-1 sur les MTs (Barlan et al., 2013) ; (Metzger et al., 2012). Dans les neurones, MAP7 rentre en compétition avec la protéine tau, tous les deux impliqués dans la formation de branchements axonaux (Monroy et al., 2018).

### VI.II.D Les MAPs déstabilisatrices

Parmi les différentes MAPs déstabilisatrices des MTs se trouvent :

#### *L'oncoprotéine 18/Stathmine*

La stathmine est une protéine de 18 kDa connue pour son rôle déstabilisateur des MTs. Son effet sur la dynamique des MTs se fait par sa liaison aux tubulines solubles les empêchant de polymériser (Honnappa et al., 2003). La stathmine se lie aussi directement aux MTs augmentant la fréquence des catastrophes aux deux extrémités, davantage au niveau de l'extrémité « - » que « + » (Manna et al., 2006).

La stathmine est exprimée dans différents types de cancers avec une corrélation entre la sensibilité des tumeurs aux agents ciblant les MTs (Akhtar et al., 2014 ; Batsaikhan et al., 2014 ; Nie et al., 2015). En effet, la surexpression de la stathmine diminue la polymérisation des MTs et par conséquent la sensibilité au paclitaxel (Alli et al., 2002). Ainsi différentes études pour trouver des antagonistes de stathmine sont en cours (Pour revue : Biaoxue et al., 2016).

#### *Les ATPases clivantes*

La katanine et la spastine sont deux ATPases qui génèrent des cassures dans la paroi des MTs en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP (McNally and Vale, 1993), Revue : (Roll-Mecak and Vale, 2008). Elles transforment les longs MTs en un grand nombre de MTs courts (Sudo and Baas, 2010; Errico et al., 2002).

Des analyses phylogénétiques montrent que fidgetine, comme la katanine et la spastine génère également des cassures des MTs (Zhang et al., 2007) surtout au niveau des bouts « - » (Mukherjee et al., 2012). Des études plus récentes montrent que la fidgetine de la drosophile favorise plutôt les MTs les moins acétylés et coupe préférentiellement les MTs dans la partie labile des MTs axonaux (Leo et al., 2015 ; Austin et al., 2017).

Cependant, la fidgetine murine et humaine présentent des mutations au niveau des domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP indiquant que cette dernière est fonctionnellement différente des autres membres de la famille (Cox et al., 2000). La fidgetine humaine inhibe l'attachement des MTs aux centrosomes (Mukherjee et al., 2012) et est impliquée dans des maladies du développement (Cox et al., 2000).

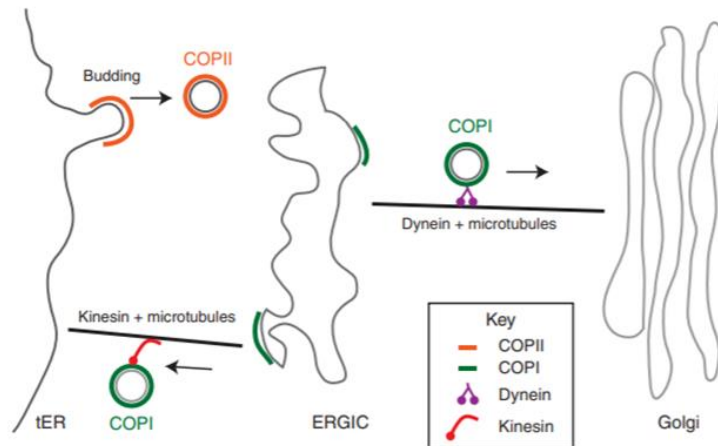
## VII. [Le rôle des microtubules dans le trafic cellulaire](#)

Les MTs jouent un rôle essentiel dans la division cellulaire en formant le fuseau mitotique important pour la bonne ségrégation des chromosomes (Revue : Meunier and Vernos, 2012). En interphase, les MTs assurent la directionnalité de la migration, (Revue : Garcin and Straube, 2019), la transduction du signal (Revue : Gundersen and Cook, 1999) et participent aussi à de multiples autres évènements cellulaires. Ici, nous décrivons le rôle des MTs dans la sécrétion protéique et le trafic membranaire.

### [VII.I Dans la sécrétion protéique](#)

Les MTs jouent un rôle dispensable dans la voie de sécrétion. En effet, les protéines peuvent diffuser du réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi puis vers la destination finale post-golgienne mais le transport sur les MTs accélère le processus (Fourriere et al., 2016).





**Figure 8: Trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi**

*Le trafic vésiculaire issu du réticulum endoplasmique (ER= Endoplasmic Reticulum) est initié lorsque le complexe de revêtement COPII trie les cargos pour former une vésicule bourgeonnante à partir du réticulum endoplasmique de transition (tER). Les cargos diffusent alors du ER au compartiment EGRIC (ER–Golgi intermediate compartment). Le trafic de l'EGRIC vers le golgi est dépendant des microtubules et de la dynéine et semble être médié par des vésicules revêtues de COPI. La vésicule EGRIC non-résidente est recyclée vers le ER. Le recyclage est dépendant de COPI et nécessite les microtubules ainsi que les kinésines.*

(Lord et al., 2013)

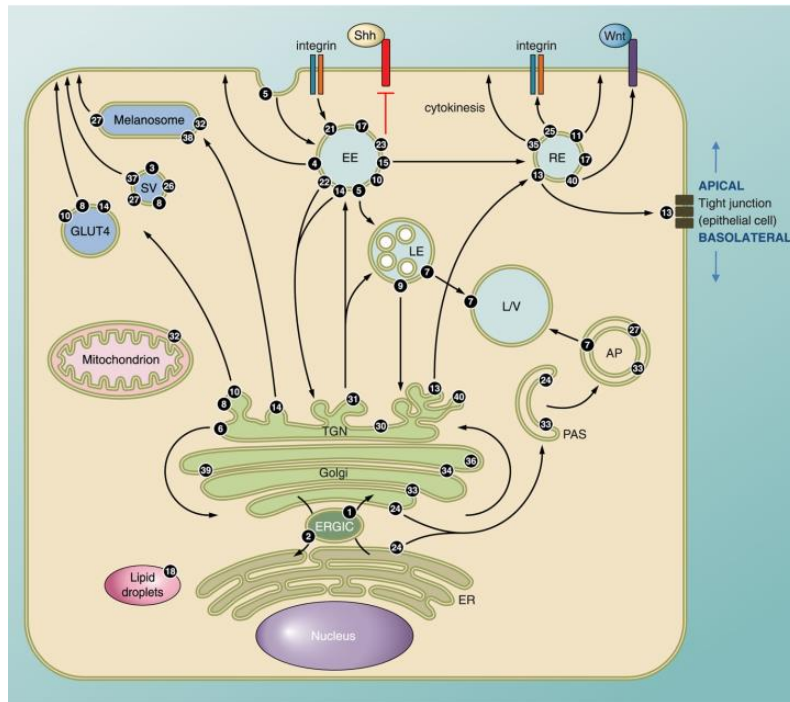
Un rôle indispensable des MTs est le positionnement et le maintien de l'intégrité de ces organites. En effet, une dépolymérisation des MTs mène à la dispersion du Golgi (Sandoval et al., 1984) et à la perturbation de la dynamique du RE (Terasaki et al., 1986). Une étude plus récente montre le rôle des MTs dans la stabilisation du RE axonal (Farías et al., 2019). L'interaction entre ces différents éléments se fait via des protéines particulières : Le RE co-localise avec les bouts « + » des MTs grâce à des protéines se trouvant à sa surface telle que CLIMP-63 (Vedrenne et al., 2005) ou ERLIN2 (Zhang et al., 2015) et est étiré vers la périphérie cellulaire par des kinésines (Waterman-Storer and Salmon, 1998) alors que le Golgi colocalise avec les bouts « - » des MTs via des MAPs telles que EB1 et EB3 (Yang et al., 2017) et est maintenu à proximité du centrosome par la dynéine cytoplasmique (Corthésy-Theulaz et al., 1992).

La première étape de la voie de sécrétion est le passage des protéines du RE (réticulum endoplasmique) au Golgi (Revue : (Mandon et al., 2013)). Les protéines se concentrent dans des éléments de transition où les vésicules recouvertes de COP II se forment (Bannykh et al., 1996). Une fois débarrassées de leur manteau de COPII, ces vésicules fusionnent pour former

le 'ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)' (Klumperman et al., 1998). Les éléments d'ERGIC sont transportés dans le sens antérograde vers l'appareil de Golgi par leur interaction avec la dynéine (Watson et al., 2005). Le transport est bidirectionnel avec les kinésines responsables du transport rétrograde de vésicules recouvertes de COPI du Golgi vers le RE (Hirokawa et al., 2009; Brown et al., 2014) (**Figure 8**). Les cargaisons qui quittent le trans-Golgi utilisent comme moyen de transport les kinésines en particulier la kinésine-1 KIF5B et la kinésine-3 KIF13B (Serra-Marques et al., 2020).

#### *L'interaction entre la cargaison et le moteur*

Il est à noter que quelques cargaisons peuvent se lier directement aux moteurs tels que la kinectine du RE (Toyoshima et al., 1992), les septines (Spiliotis et al., 2005 ; Zhu et al., 2008) mais la majorité ont besoin d'adaptateurs. Par exemple, les protéines adaptatrices de dynéine Bicaudal D1 et Bicaudal D2 médient l'interaction de dynéine à la membrane du Golgi via l'interaction avec la GTPase Rab6 (Matanis et al., 2002). Les protéines Rab (Small Ras-like GTPases) sont des enzymes qui selon qu'elles lient le GTP ou de GDP changent de conformation ce qui permet le recrutement de divers effecteurs impliqués dans le trafic. Parmi ces effecteurs, figurent des moteurs moléculaires dont l'interaction avec les cargaisons est régulée par les protéines Rab. Il existe plus de 60 protéines Rab identifiées chez les humains, qui sont localisées dans différents endroits dans la cellule et associées spécifiquement à différentes voies de transport vésiculaire (Revue : Hutagalung and Novick, 2011) (**Figure 9**).



**Figure 9: Localisation intracellulaire des Rab**

Chaque chiffre correspond à une Rab particulière. AP: Autophagosome, ERGIC: ER-Golgi intermediate compartment, ER: Endoplasmic reticulum, EE: Early Endosome, LD: Lipid Droplet, LE: Late endosome, L/V: lysosome/vacuole, PAS: Preautophagosomal structure, RE: Recycling endosome, SV: secretory vesicle/granule.

(Hutagalung and Novick, 2011)

## VII.II Rab impliquées dans l'endocytose et abordées dans ce travail

L'endocytose est un mécanisme d'internalisation des éléments extracellulaires par des invaginations membranaires qui finissent par s'étrangler pour former des vésicules intracytoplasmiques. Plusieurs éléments peuvent être internalisés tel que des nutriments, un récepteur membranaire par suite d'une activation par un signal extracellulaire, une bactérie etc. Selon leur destination finale, les vésicules intracellulaires peuvent être entourées par une variété de protéines cytosoliques telle que la clathrine (Brodsky, 2016). Dans les cellules animales, le trafic membranaire dépend des MTs ainsi que des kinésines et dynéines permettant le transport des vésicules. L'interaction des Rabs avec ces moteurs joue un rôle crucial dans la régulation du trafic membranaire.

Rab5 se trouve sur les vésicules recouvertes de clathrine et participe à leur fusion avec les endosomes précoces. La présence de Rab5 sur les endosomes précoces régule leurs déplacements sur les MTs, leur maturation et leur fusion. Les endosomes, par un switch de Rab et de pH, peuvent évoluer en des endosomes de recyclage caractérisés par la présence de Rab11 (Hsu and Prekeris, 2010) et Rab35 (Kouranti et al., 2006) qui guident l'endosome vers la membrane plasmique. Ils peuvent aussi, par un échange de Rab5 contre Rab7 (Poteryaev et al., 2010), évoluer en des endosomes tardifs qui seront transportés par Rab7 vers les lysosomes pour une éventuelle dégradation des protéines ubiquitinylées (Raiborg and Stenmark, 2009 ; Mellman, 1996) (**Figure 9**).

Rab35 identifiée en 1994 et a été classifiée comme homologue de Rab1A et Rab1B (Zhu et al., 1994) qui régulent le trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Stenmark, 2009). Contrairement à ses homologues, Rab35 est important dans le trafic endosomal et le recyclage assurant une bonne cytokinèse (Kouranti et al., 2006). Cette protéine Rab est présente au niveau de la membrane plasmique, majoritairement dans des régions riches en phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) et au niveau de vésicules endosomales recouvertes de clathrine (Kouranti et al., 2006). Rab35 activée recrute la phosphatase effectrice OCRL au niveau des vésicules endosomales. Cette enzyme hydrolyse le PIP2 en phosphatidylinositol 4 phosphate (Lowe, 2005) ce qui résulte en l'élimination du manteau de clathrine, permettant la suite du trafic (Cauvin et al., 2016). Une anomalie de fonctionnement de Rab35 résulte en une accumulation de PIP2 au niveau des vésicules et la translocation de SEPT2 (voir la partie III de la thèse) de la membrane plasmique vers ces vésicules ainsi que l'accumulation de F-actine ce qui pourrait expliquer les défauts qu'il induit dans la cytokinèse (Kouranti et al., 2006).

Rab35 module la dynamique de l'actine de façon directe et indirecte. Dans les cellules BHK (baby hamster kidney), Rab35 co-localise avec l'actine ainsi que les Rho GTPases Rac1 et Cdc42 qui régulent les changements de la forme des cellules en agissant sur le cytosquelette d'actine (Hall, 2005). En effet, il existe une corrélation entre Rab35 et Cdc42 car un Rab35 constitutivement actif est capable d'activer Cdc42. Ceci influence la formation de longues protrusions cellulaires (Chevallier et al., 2009). L'orthologue de Rab35 chez la drosophile module directement l'activité dynamique de l'actine via sa protéine effectrice fascine (Zhang

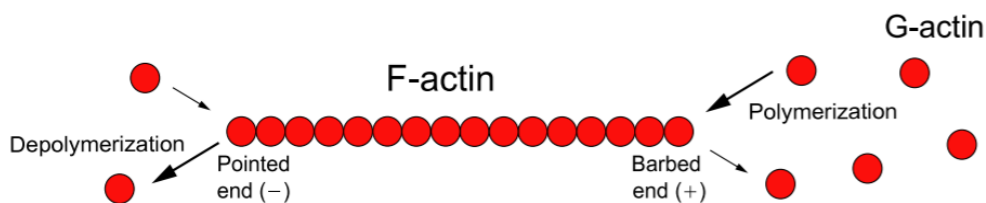
et al., 2009). Fascine est une protéine d'entrecroisement qui lie les filaments d'actine entre eux et induit le bundling et la formation de filopodes (Vignjevic et al., 2006).

Les moteurs moléculaires associées aux MTs qui sont impliqués dans les mouvements membranaires des voies d'endocytose sont d'une part le complexe dynéine/dynactine, et d'autre part des kinésines appartenant aux familles de kinésines-1 (KIF5), des kinésines-2 (KIF3A/B), des kinésines-3 (KIF13A, KIF16B, KIF1B $\beta$ ) et aussi des kinésines-14 (KIFC1 et KIFC2 qui se dirigent vers l'extrémité moins des MTs) (pour revue, voir Granger et al., 2014).

## Partie II : Les filaments d'actine

### I. Structure et composition de l'actine

L'actine est une protéine globulaire (G-actine) de 42 kDa qui s'auto-associe pour former un homopolymère appelé le filament d'actine (F-actine). Ce dernier possède une structure hélicoïdale double brin (Holmes et al., 1990). Comme les MTs, les filaments d'actine sont polarisés avec deux extrémités dynamiquement différentes : l'extrémité barbée à croissance rapide et où a lieu la polymérisation et l'extrémité pointue à croissance lente et où a lieu la dépolymérisation (**Figure 10**).

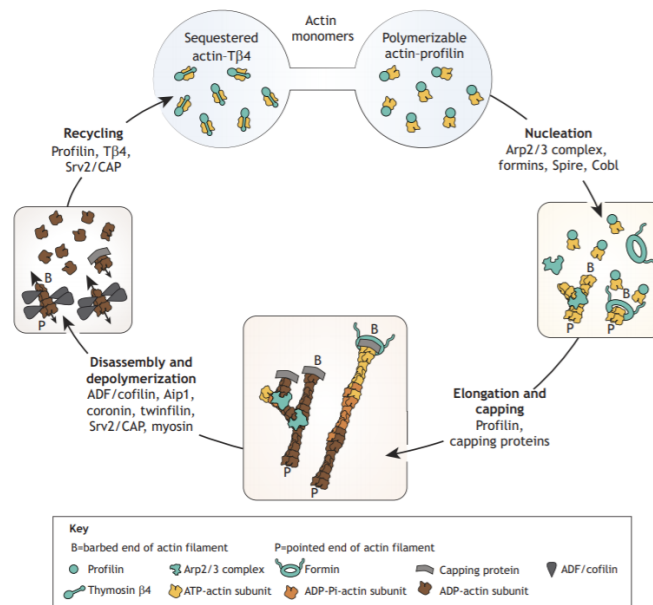


**Figure 10: Représentation d'un filament d'actine et de son dynamisme**

(Nonaka et al., 2011)

### II. La dynamique des filaments d'actine

L'état d'équilibre dynamique de l'actine a lieu quand il y a un équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine. Cet équilibre dynamique est formé de 4 étapes : La nucléation, l'élongation, le désassemblage et le recyclage (**Figure 11**).



**Figure 11: Les différentes étapes du dynamisme des filaments d'actine**

L'actine séquestrée et polymérisable représente le pool de monomères d'actine. La nucléation est la formation de dimères ou trimères d'actine. L'élongation et le coiffage modulent la croissance contrôlée des différentes formes d'organisation de l'actine (généralisé soit par le complexe Arp2/3 ou les formines). Le désassemblage et la dépolymérisation entraînent la décomposition des structures d'actine en monomères. Le recyclage renouvelle le pool de monomères d'actine chargés en ATP. Les différents états nucléotidiques de l'actine, des extrémités barbelées et pointues et des différentes protéines ou complexes sont représentés par les symboles indiqués.

(Plastino and Blanchoin, 2019)

## II.1 La nucléation

La vitesse d'assemblage d'actine est proportionnelle à la concentration de monomères libres dans le cytoplasme. La majorité des monomères sont liés à la protéine profiline, un facteur d'échange nucléotidique qui permet à l'actine de passer à l'état ATP, mais qui ne permet pas la formation spontanée de dimères et trimères d'actine (Pollard et al., 2000). D'autres monomères sont non polymérisables à cause de leur séquestration par des protéines telle que la thymosine  $\beta 4$  (Pantaloni and Carlier, 1993).

La nucléation nécessite la formation d'un assemblage stable de dimères et trimères d'actine. Ce phénomène est accéléré par : Le complexe Arp2/3, composé de 7 protéines (Mullins et al., 1998), la famille des formines et les protéines Spire et Cobl qui induisent la nucléation en attachant 2 ou 3 monomères ensemble (Campellone and Welch, 2010). L'activité du complexe

Arp2/3 et de la famille des formines est régulée directement ou indirectement par les Rho-GTPases membranaires (Lawson and Ridley, 2018).

## II.II L'élongation

Après la formation des nuclei, les monomères s'ajoutent en fonction de la concentration de monomères libres (Wegner and Engel, 1975) qui doit être supérieure à une concentration critique de 0,1  $\mu\text{M}$  (Pollard et al., 2000). La polymérisation nécessite l'hydrolyse de l'ATP à l'intérieur du filament et la dissociation du phosphate (Melki et al., 1996). L'élongation est régulée par des protéines de coiffe qui se fixent sur les extrémités barbées et bloquent l'élongation (Iwasa and Mullins, 2007). De façon antagoniste, les protéines de la famille des formines se fixent sur les extrémités barbées et jouent le rôle de machinerie d'élongation (Block et al., 2012).

## II.III Le désassemblage

Le désassemblage des filaments d'actine a lieu de deux façons : Fragmentation des filaments préexistants ou dépolymérisation en monomères.

La fragmentation peut avoir lieu suite à la contraction induite par les protéines de la famille des myosines (Murrell and Gardel, 2012). La myosine est une ATPase qui, en hydrolysant l'ATP, génère de l'énergie pour se déplacer le long de l'actine. Il existe 13 membres de cette famille, la plus connue étant la myosine II qui est responsable de la contraction musculaire et de la cytokinèse (Hartman and Spudich, 2012).

La dépolymérisation peut être induite, selon l'organisation cellulaire des filaments d'actine, par les protéines de la famille des ADF/cofiline (Actin Depolymerizing Factor) (Blanchoin et al., 2000), par Aip1 (Actin-interacting protein 1), coronin (Nadkarni and Brieher, 2014), et par des accélérateurs de dépolymérisation comme twinfilin et Srv2/CAP (cyclase associated protein) (Johnston et al., 2015). La dépolymérisation des deux bouts du filaments a également lieu suite à l'effet de l'oxydase MICAL1 (Molecule Interacting with CasL) (Commentaire : Frémont et al., 2017a). Deux hypothèses ont été mises en place pour expliquer l'effet de cette monooxygénase sur la polymérisation et dépolymérisation de l'actine : L'hypothèse 1 cite que cet effet est due aux ROS (Reactive Oxygen Species) produits par MICAL1 qui modifient les résidus cystéine, méthionine et tryptophane de l'actine (Fedorova et al., 2010), mais ceci s'est



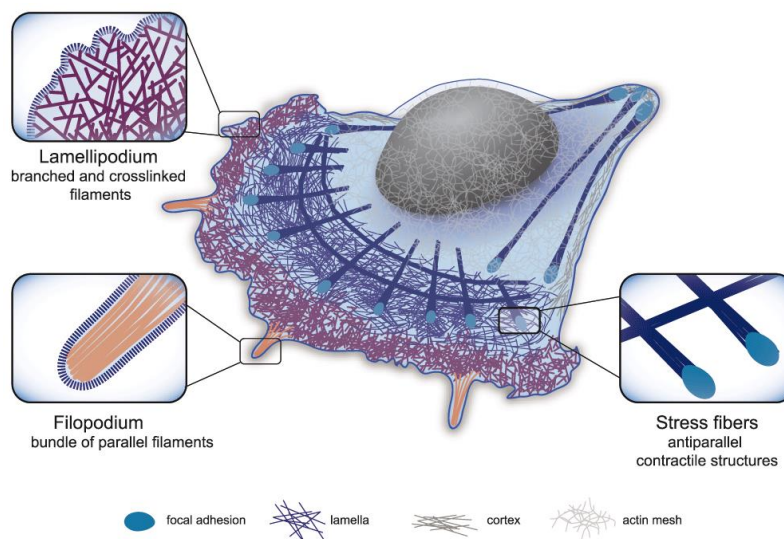
avéré pas suffisant pour induire la dépolymérisation de l'actine (Frémont et al., 2017b). L'hypothèse 2 mentionne que les MICALs oxydent deux résidus méthionine de l'actine : M44 et M47 en méthionine sulfoxyde (Hung et al., 2011, Hung et al., 2010) affectant ainsi des résidus clés pour l'interface entre deux sous-unités successives d'actine dans un filament (Hung et al., 2010) et induisant donc la dépolymérisation de l'actine.

## II.IV Le recyclage

Les monomères libres dans le cytoplasme suite au désassemblage sont liés à l'ADP et ensuite séquestrés par interaction avec la thymosine  $\beta$ 4. Afin qu'ils deviennent re-polymérisables, profiline et Srv2/CAP dissocient ADF/cofiline et jouent le rôle d'échangeur de nucléotides afin de reconstituer le pool de monomères d'actines liés à l'ATP (Blanchoin and Pollard, 1998).

## III. Organisation cellulaire des filaments d'actines

Les cellules eucaryotes sont capables d'organiser les filaments d'actine en différentes structures.



**Figure 12: Les différentes organisation de l'actine**

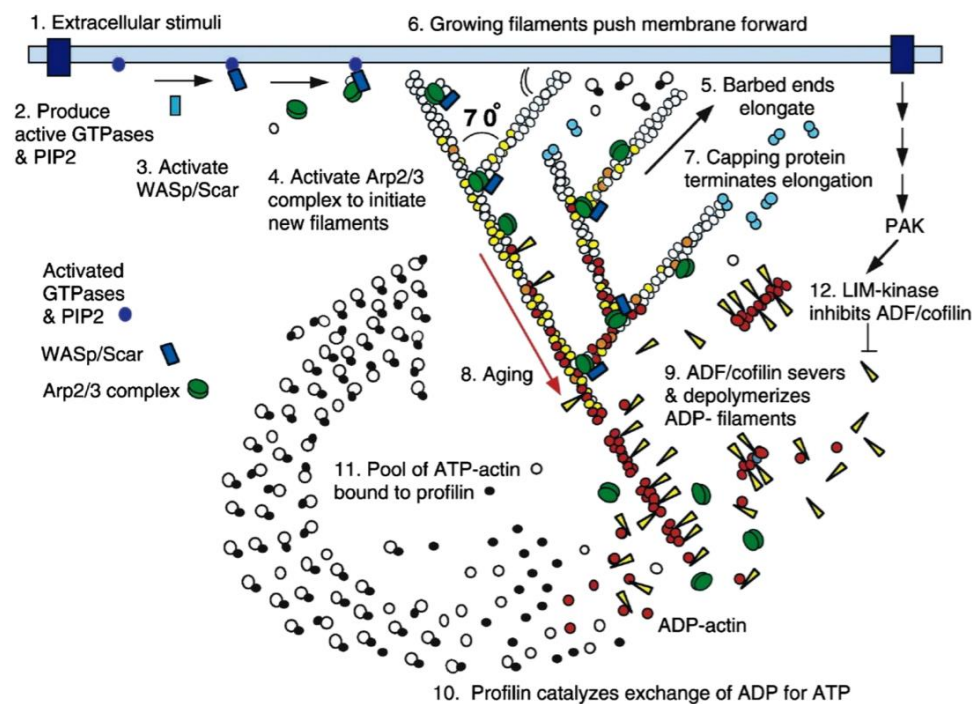
*Représentation schématique des trois principales structures d'actine présentes dans la cellule : 1) Lamellipodes : réseau dense et ramifié impliqué dans la protrusion cellulaire. 2) Filopodes : structure composée de filaments alignées et située au niveau du front de migration. 3) Les fibres de stress : des structures contractiles constituées de filaments d'actine antiparallèles et/ou de polarité mixtes associés à la myosine.*

*Les régions agrandies mettent en évidence l'organisation spécifique de l'actine des différentes structures cellulaires de l'actine.*

(Letort et al., 2015)

Les filaments d'actine sont considérés comme des éléments mécaniques qui induisent les changements de la forme cellulaire et régulent la motilité. Afin d'accomplir leurs fonctions cellulaires, les microfilaments d'actines s'assemblent en différentes structures (**Figure 12**).

- Les lamellipodes : Ce sont des protrusions membranaires, acteurs majeurs de la motilité cellulaire, formés de filaments d'actine branchés en réseau appelé réseau d'actine dendritique (Svitkina and Borisy, 1999). La formation de ces protrusions est induite par un signal extracellulaire qui active le complexe Arp2/3 qui mène à la nucléation des nouveaux filaments sur les côtés de filaments existants à un angle de  $70^\circ$  du front de migration ce qui permet de générer des forces au niveau du front de migration. La polymérisation et la dépolymérisation sont contrôlées par les protéines de coiffes et le complexe ADF/cofiline respectivement (**Figure 13**).

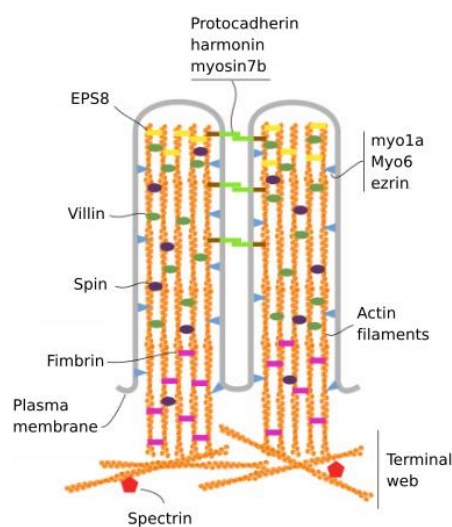


**Figure 13: Le modèle de formation du réseau d'actine dendritique**

*Les protéines proches de la membrane activent le complexe Arp2/3 qui induit la nucléation de nouvelles extrémités barbelées au niveau d'un filament mère existant (étapes 1-4). La polymérisation au niveau de l'extrémité barbelée du filament est arrêtée par la liaison des protéines de coiffage (étapes 5-7). La dépolymérisation des filaments vieillissants crée des oligomères et des monomères qui diffusent et repolymérisent (étapes 8-11). L'action de l'ADF/cofiline est inhibée par la LIM-kinase (étape 12).*

Selon (Holz and Vavylonis, 2018) basé sur l'étude de (Pollard and Borisy, 2003)

- Les filopodes : Des protrusions membranaires formées par des faisceaux de filaments d'actine parallèles, ayant leurs extrémités barbées orientées dans la même direction, vers la membrane cellulaire. Ce sont des structures importantes pour l'établissement des contacts intercellulaires et pour la directionnalité de la migration cellulaire.
- Les microvillosités : Des protrusions membranaires formées d'approximativement 20 filaments d'actine parallèles avec leurs bouts « - » vers l'extrémités des microvillosités ainsi que des protéines qui régulent l'organisation de ces structures (Bretscher and Weber, 1978). Les protéines fimbrine (Bretscher and Weber, 1980) et villine (Bretscher and Weber, 1979) connectent les filaments, la myosine Myo1A (Tyska and Mooseker, 2002) et calmoduline font la connexion entre les filaments et la membrane plasmique (Howe and Mooseker, 1983). Les microvillosités interagissent entre eux pour maintenir une organisation dense ce qui permet d'augmenter la surface cellulaire pour l'absorption (Revue : (Sauvanet et al., 2015)) (**Figure 14**).

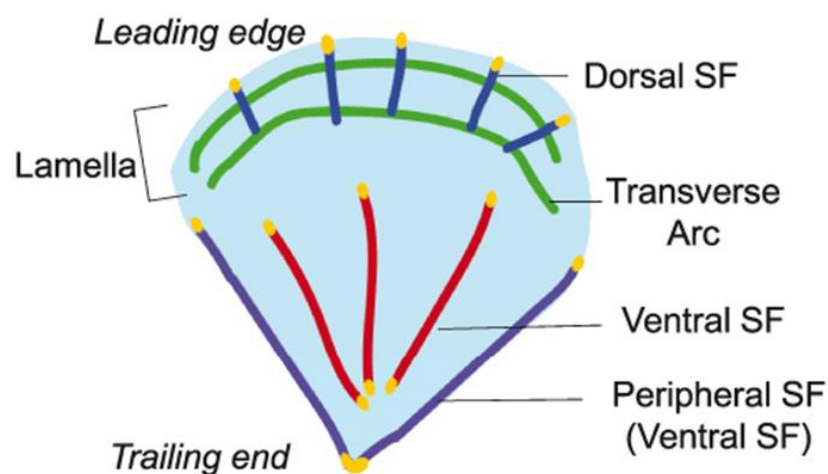


**Figure 14: L'organisation des microvillosités**

(Crawley et al., 2014)

- Le cortex cellulaire : Couche d'actine qui recouvre la membrane plasmique à l'arrière et aux cotés de la cellule. Elle est importante pour maintenir la morphologie cellulaire.

- Les fibres de stress : Ce sont des faisceaux de filaments d'actine antiparallèles donc présentant des polarités opposées. C'est un élément clé de la mécano-transduction connectant le cytosquelette à la matrice extracellulaire par des sites d'adhérences focales. Les fibres de stress sont divisées en 3 catégories (**Figure 15**) : Les fibres dorsales, non contractiles et les fibres contractiles à cause de la présence de myosine II, elles-mêmes divisées en deux sous-catégories : 1) Les arcs transverses, parallèles au front de migration et non ancrés dans les adhérences focales 2) Les fibres de stress ventrales, parallèles à la direction du mouvement qui lient les sites d'adhérences focales. C'est avec les fibres de stress qu'interagissent majoritairement nos protéines d'intérêt les septines et ceci sera détaillé plus dans la partie III de la thèse (Joo et al., 2007 ; Kinoshita et al., 2002 ; Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Targa et al., 2019).



**Figure 15: Les différentes populations de fibres de stress**

(Lee and Kumar, 2016)

#### IV. Interrelations actine-microtubules

La coordination entre les filaments d'actine et les MTs est importante pour assurer la coordination de différents événements cellulaires chez les eucaryotes tels que la division

cellulaire, la migration, et l'élongation de protrusions neuronales. Le lien entre l'actine et les MTs se fait via des protéines ou des complexes protéiques liant à la fois les deux éléments du cytosquelette par exemple :

#### IV.I Les spectraplakines

Les spectraplakines appartiennent à la famille des spectrines capables de se lier à la fois à l'actine et aux MTs. Ces protéines possèdent au niveau de leur partie N-terminale un motif contenant deux domaines CH (Calponin Homology) 1 et 2 qui leurs permettent de se lier à l'actine (Sjöblom et al., 2008). Elles peuvent se lier aux MTs par leur liaison à des protéines associés aux MTs. Les spectraplakines des mammifères MACF1 (Microtubule and Actin Crosslinking Factor 1) aussi connue sous le nom de ACF7 (Actin crosslinking factor 7) possèdent des motifs SxIP retrouvé également dans les +TIPs ce qui leur permettent se lier à EB1 (Slep et al., 2005) et de se concentrer aux bouts + des MTs (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Ces protéines jouent un rôle important dans la stabilisation des MTs (Drabek et al., 2006 ; Kodama et al., 2003) ; mais n'ont pas d'effet majeur sur la dynamique des filaments d'actine (Kodama et al., 2003). La régulation de la dynamique des MTs par ACF7 est importante dans le turnover des adhérences focales, nécessaire pour la migration cellulaire. En l'absence d'ACF7 responsable du guidage des bouts « + » des MTs vers les adhérences focales (AF), les MTs ne peuvent pas bien converger vers les AF, ce qui limite leur stabilisation et la migration cellulaire (Wu et al., 2008) ; (Wu et al., 2011) ; (Yue et al., 2016).

#### IV.II. IQGAP1

IQGAP1 est une protéine d'échafaudage qui joue un rôle important dans la régulation de la dynamique des filaments d'actine (Gorman et al., 2012) d'une part en se liant directement à l'actine via son domaine CH N-terminal (Watanabe et al., 2004) d'autre part, par sa capacité à interagir avec plusieurs régulateurs du réseau d'actine comme Cdc42 et Rac1 (Bashour et al., 1997). IQGAP1 interagit aussi avec les MTs via CLIP-170 (Fukata et al., 1997 ; Fukata et al., 2002 ; Gundersen, 2002), APC (Tirnauer, 2004) et EB1 (Tian et al., 2014).

L'interaction entre les MTs et l'actine peut induire la capture des extrémités « + » des MTs par les faisceaux d'actine, jouant ainsi le rôle de barrière (López et al., 2014). L'étude de (Henty-Ridilla et al., 2016) montre *in vitro* que les extrémités « + » des MTs stimulent l'assemblage de

l'actine via l'association de CLIP-170 et DIAPH1 (Diaphanous-related formin mDia1). De plus, les MTs stimulent la polymérisation de l'actine par la signalisation via des Rho GTPase telle que Rac (Margaron et al., 2013).

#### IV.III L'effet de l'interaction actine-MTs sur le trafic intracellulaire

Parmi les différents événements cellulaires influencés par l'interaction actine-MTs on peut citer les exemples suivants :

La sécrétion du surfactant par les pneumocytes de type II des alvéoles pulmonaires se fait par exocytose via de larges vésicules sécrétoires. Les vésicules sont entourées par un manteau d'actine qui, par sa compression, facilite la libération du surfactant. L'étude de (Müller et al., 2019) montre qu'une dépolymérisation des MTs par le nocodazole inhibe la formation de ce manteau d'actine et de la polymérisation de l'actine sur les vésicules sécrétoires. De plus la protéine IQGAP1 par ailleurs colocalisée avec CLIP-170, est aussi retrouvée au niveau des vésicules de sécrétion fusionnées avec la membrane plasmique. Elle contribue à l'élaboration du manteau contractile d'actine qui permet d'expulser le surfactant.

Chez le champignon *Aspergillus nidulans*, les mêmes cargaisons sécrétoires alternent entre les filaments d'actines et les MTs pour leur transport du réseau trans-golgien vers la membrane plasmique. En effet, ces vésicules sont transportées vers le bout « + » des MTs par la kinésine avant d'être cédées à la myosine V qui effectue la dernière étape de transport vers la membrane plasmique (Peñalva et al., 2017). Similairement à ce qui est observé chez les champignons, le suivi par microscopie confocale de vésicules d'endocytose du récepteur HER2 (Human Epidermal factor 2 Receptor) dans les cellules cancéreuses KPL4 montre que les vésicules proches de la membrane plasmique sont transportées par l'actine avant de passer vers les MTs pour leurs arrivées vers le noyau (Watanabe and Higuchi, 2007).

Chez les plantes, de courts filaments d'actine se déplacent le long des MTs après dépolymérisation du réseau d'actine (Sampathkumar et al., 2011). Il se peut que l'actine soit transporté par la kinésine conventionnelle le long des MTs (Schneider and Persson, 2015) , même si cela n'est pas encore observé *in vitro* ou bien par la kinésine CHO1/MKLP1/KIF23 qui possède la capacité de lier à la fois l'actine et les MTs (Kuriyama et al., 2002).

#### IV.IV L'effet de l'interaction actine-MTs sur la cytokinèse

La formation de l'anneau contractile durant la cytokinèse est régulée par RhoA (Fededa and Gerlich, 2012). Les MTs participent à la formation de cet anneau en délivrant, par le moteur moléculaire : kinésine VI, un activateur de RhoA, ECT2 (Yüce et al., 2005). RhoA à son tour recrute l'anilline, une protéine de l'anneau contractile qui interagira avec la myosine II, les septines et la membrane plasmique. Ainsi, les septines en interagissant avec l'anilline recruté par RhoA activé par un activateur transporté par la kinésine VI, participent à cause de leurs interactomes à la relation entre actine et MTs. De plus, des expériences sur des neurones montrent que SEPT6 initie l'organisation des filaments d'actine en filopodes et SEPT7 altère l'organisation des microtubules axonaux promouvant ainsi leur localisation dans ces filopodes (Hu et al., 2012).

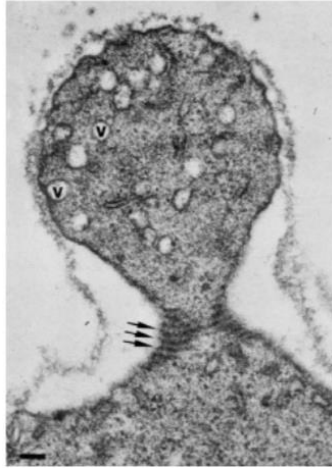
## Partie III : Les septines

### I. Propriétés générales des septines

#### I.I La découverte de la famille des septines

La découverte des septines a été faite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans une étude qui consistait à identifier des gènes impliqués dans la division cellulaire en induisant des mutations sensibles à la température (Hartwell, 1971). Quatre gènes ont ainsi été identifiés, dont la mutation induisait des défauts similaires de la cytokinèse : Cdc3, Cdc10, Cdc11 et Cdc12 (Cdc = cell division cycle). Les mutations au niveau de ces gènes n'affectaient pas la réplication de l'ADN mais empêchaient le détachement du bourgeon de la cellule mère. La visualisation d'une levure en bourgeonnement par microscopie électronique indiquait que des filaments épais sous forme d'anneaux entouraient le col du bourgeon et que des mutations dans l'un ou l'autre des 4 gènes découverts résultaient en la disparition de cet anneau (Byers and Goetsch, 1976). La localisation des protéines Cdc3, Cdc10, Cdc11 et Cdc12 a été identifiée par immunofluorescence au niveau de cet anneau qui entoure le col du bourgeon (Haarer and Pringle, 1987 ; Kim et al., 1991). En 2008, ces protéines ont été nommées 'septines' par Pringle pour leur rôle dans la division cellulaire et plus précisément la septation (Pringle, 2008) (**Figure 16**).





**Figure 16 : Bourgeon de *Saccharomyces cerevisiae* vu en microscopie électronique**

Image montrant la localisation des septines (flèches) au niveau de l'anneau contractile au cours du processus de séparation du bourgeon de la cellule mère. Le bourgeon contient des vésicules (V)

(Byers and Goetsch, 1976)

## I.II Polymorphisme et localisation tissulaire

Depuis la découverte des septines chez les levures, des séquences homologues ont été identifiées chez les champignons, animaux et protistes. Bien qu'aucune séquence homologue n'ait été retrouvée chez les plantes (Nishihama et al., 2011 ; Pan et al., 2007), il existe des protéines structurellement proches qui constituent une famille de para-septines Aig1-Toc34/Toc159. Aig1 joue un rôle dans la défense anti-pathogène alors que Toc34/Toc159 jouent un rôle dans le mécanisme d'importation des peptides dans les chloroplastes (Leipe et al., 2002). Le nombre de septines varie entre les espèces. Par exemple, la famille de septines de *Saccharomyces cerevisiae* est constituée de 7 membres (Cdc10, Cdc3, Cdc11, Cdc12, Sh1, Spr3 et Spr28) alors que chez les humains 13 membres ont été identifiés (SEPT1-12 et 14) (Kinoshita et al., 2002). L'expression de 13 gènes différents donne comme produits les 13 septines humaines dont les tailles varient de 39 à 65kDa (**Tableau 1**) et dont les séquences en acides aminés sont similaires pour plus de 35% (McMurray and Thorner, 2019). Ces gènes génèrent un ou plusieurs polypeptides par épissage alternatif et/ou traduction à partir de différents codons d'initiation (Sellin et al., 2012). Il est à noter que SEPT13 est actuellement reconnu comme étant un des différents pseudogènes de SEPT7 (Russell and Hall, 2011).

**Tableau 1: Transcrits et isoformes de gènes et pseudogènes de septines humaines (En se basant sur la base de données Genbank®)**

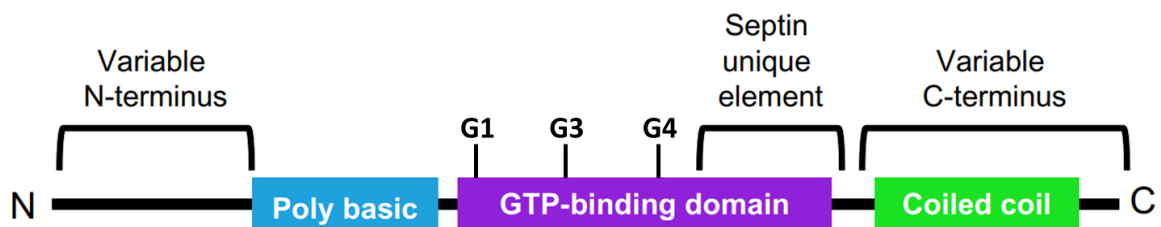
Gène	Localisation chromosomale	Pseudogènes	Nombre de transcrits	Nombre d'isoformes	Masse de la protéine (kDa)	Statut RefSeq NCBI	Référence Genbank®
Sept1	16p11.2	-	2	1	41,8	En révision	Gene ID: 1731
Sept2	2q37.3	-	31	8	41,5	Validé	Gene ID: 4735
Sept3	22q13.2	-	3	3	39,3	En révision	Gene ID: 55964
Sept4	17q22	-	10	10	55,1	En révision	Gene ID: 5414
Sept5	22q11.21	-	2	2	42,3	En révision	Gene ID: 5413
Sept6	Xq24	-	4	3	48,9	En révision	Gene ID: 23157
Sept7	7p14.2	15	5	4	48,8	En révision	Gene ID: 989
Sept8	5q31.1	-	6	6	55,8	En révision	Gene ID: 23176
Sept9	17q25.3	-	11	7	65,4	En révision	Gene ID: 10801
Sept10	2q13	1	21	21	60	En révision	Gene ID: 151011
Sept11	4q21.1	-	2	2	49,4	Validé	Gene ID: 55752
Sept12	16p13.3	-	2	2	40,8	En révision	Gene ID: 124404
Sept14	7p11.2	23	1	-	50,03	Validé	Gene ID: 346288

L'expression de ces gènes est majoritairement ubiquitaire, à l'exception de Sept3 qui s'exprime exclusivement dans le cerveau et de Sept12 et Sept14 qui s'expriment uniquement dans les testicules (Fagerberg et al., 2014).

### I.III Domaines fonctionnels

Les septines appartiennent à la famille des GTPases contenant une boucle P comme pour les kinésines, myosines et les protéines Ras (Leipe et al., 2002). Les régions N et C-terminales des septines sont variables du point de vue de la taille et de la composition en acides aminés, pouvant contribuer à des différences dans leurs interactions protéiques et donc de leurs fonctionnements biologiques. Après la partie N-terminale variable se trouve une première région polybasique (PB1) responsable de la liaison des septines aux phosphoinositides (PI) de la membrane plasmique (Casamayor and Snyder, 2003 ; Zhang et al., 1999).

L'étude récente de (Omrane et al., 2019) détecte l'existence au niveau de SEPT9 d'une deuxième région polybasique formée des 4 acides aminés 399-402 qui est conservée dans les autres septines humaines et qui est également responsable de l'interaction des septines avec les PI de la membrane. Cette étude montre aussi que, adjacent à ces domaines polybasiques, se trouvent des hélices amphipatiques A participant aussi à la liaison des septines à la membrane. En aval de PB1, se trouve le domaine de liaison au GTP. Il contient 3 motifs qui sont conservés dans toute la famille des GTPases contenant une boucle P (Field and Kellogg, 1999). Le motif G1 : GxxxxGKS/T forme une boucle flexible et interagit avec le groupe phosphate du nucléotide. Le motif G3 contient plusieurs résidus hydrophobes suivi par DxxG (Saraste et al., 1990; Leipe et al., 2002). Il participe à la liaison du  $Mg^{2+}$  et du  $\gamma$ -phosphate du GTP. Le motif G4 NKxD est important pour la spécificité de liaison au GTP (Dever et al., 1987). Le domaine de liaison au GTP se termine par un motif unique aux septines, ce qui les distingue des autres membres de la famille (Versele and Thorner, 2004 ; Pan et al., 2007 ; Steels et al., 2007). La partie C-terminale peut contenir jusqu'à 3 domaines 'coiled-coil' comme elle peut en être exempte. Ces domaines pourraient être nécessaires pour les interactions avec les autres septines ou avec des substrats (Casamayor and Snyder, 2003 ; Versele and Thorner, 2005 ; Meseroll et al., 2013 ; Szuba et al., 2020).



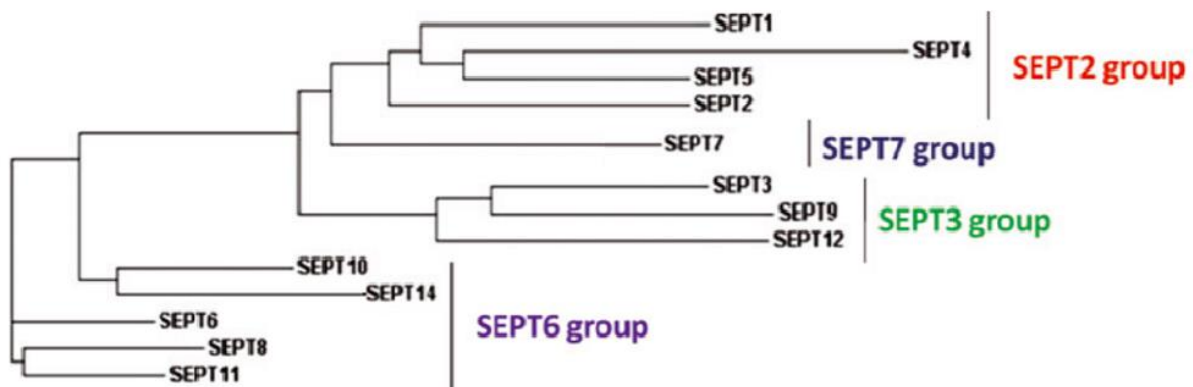
**Figure 17: Les différents domaines des septines**

*De gauche à droite : Le domaine N-terminal variable, le domaine polybasique, le domaine de liaison au GTP contenant les motifs suivants : G1 : GxxxxGKS/T, G3 : contenant plusieurs résidus hydrophobes suivi par DxxG, et G4 : NKxD, un domaine unique aux septines et la région C-terminale variable, contenant, selon les septines, un seul, plusieurs ou pas de domaines coiled-coil.*

(Fung et al., 2014) modifié selon les données de (Pan et al., 2007)

L'analyse phylogénétique des septines montre qu'elles peuvent être classées en 4 sous-groupes selon leurs homologies de séquence et le nombre de domaines coiled-coil présents dans la région C-terminale (**Figure 18**). Le groupe 3 est caractérisé par l'absence de domaine

‘coiled-coil’, le groupe 2 contient deux domaines ‘coiled-coil’ alors que le groupe 6 n’en possède qu’un seul. Le groupe 7 est formé par un seul membre qui est la SEPT7 caractérisée par un seul domaine ‘coiled-coil’. Ces 4 sous-groupes possèdent des similarités de séquence avec les septines de *Saccharomyces cerevisiae* (Versele and Thorner, 2005), avec Cdc11p l’équivalent du groupe SEPT2, Cdc10p l’équivalent du groupe SEPT3, Cdc3p l’équivalent du groupe SEPT6 et Cdc12p l’équivalent du groupe SEPT7.



**Figure 18: Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines**

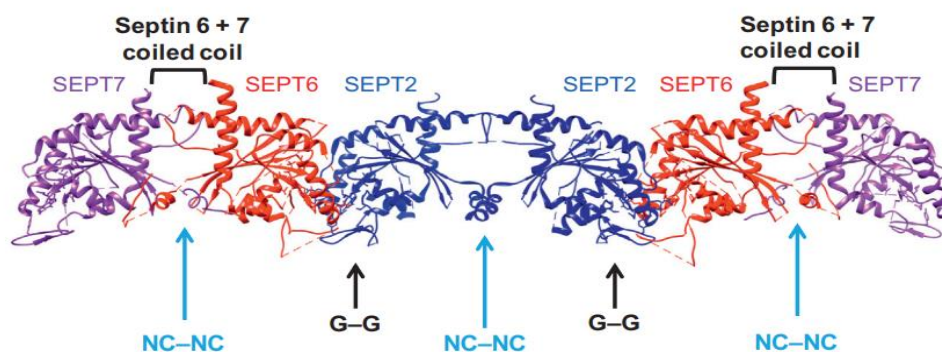
(Peterson and Petty, 2010)

#### I.IV Polymérisation

Depuis leur découverte, les septines ont été considérées comme protéines qui fonctionnent en complexes. La première caractérisation biochimique des septines a été faite chez la drosophile, et a révélé que les septines formaient des complexes hexamériques (Field et al., 1996 ; Oegema et al., 1998). Ces complexes ont été identifiés chez différentes espèces de levures (Frazier et al., 1998 ; Kaneko et al., 2004). Le fait que les mammifères expriment 13 septines différentes rend la détermination de l’arrangement des sous-unités des hétéro-oligomères plus complexe. Néanmoins, un complexe est formé par l’association de septines issues de différents groupes, sachant que les protéines d’un même groupe peuvent être interchangeables (Kinoshita, 2003 ; Sandrock et al., 2011 ; Sellin et al., 2011). Les complexes isolés de cultures cellulaires sont SEPT2/6/7/9, SEPT2/6/7, SEPT7/9/11 (Nagata et al., 2004), SEPT3/5/7 et SEPT5/7/11 (Kinoshita et al., 2002 ; Fujishima et al., 2007 ; Sellin et al., 2011).

#### I.IV.A Le modèle hexamère de (Sirajuddin et al., 2007)

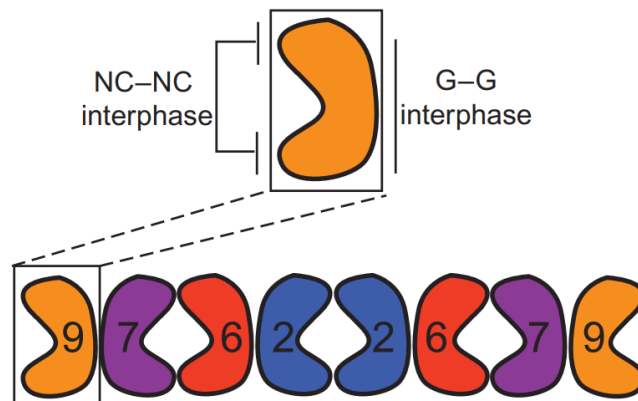
La coexpression des SEPT2, SEPT6 et SEPT7 de mammifères dans *Escherichia coli* mène à une purification d'un complexe contenant un ratio 1 :1 :1 de chaque septine, ce qui ressemble aux complexes innés isolés des cultures de cellules de mammifères (Kinoshita et al., 2002), (Nagata et al., 2004). L'équipe de Sirajuddin s'est basée sur deux techniques afin d'identifier la nature du complexe purifié. La première technique a constaté en l'analyse du complexe par microscopie électronique qui a montré qu'il s'agissait d'un hexamère linéaire. Afin d'identifier l'ordre dans lequel les septines se trouvaient, ils ont fusionné le gène MalE (ou MBP=Maltose-binding protein) à la partie N-ter de SEPT2 et l'ont coexprimé avec SEPT6 et SEPT7 dans *E. coli*. Ils ont pu identifier la présence de SEPT2 au centre de l'hexamère. Ceci a été confirmé par la deuxième approche consistant en une analyse cristallographique du complexe. L'analyse a révélé une symétrie miroir avec SEPT2 au centre. L'organisation du complexe consiste en des interactions face à face entre les domaines de liaison au GTP (interface G-G) et des interactions dos à dos aux surfaces N et C-ter qui sont de part et d'autre du site de liaison du nucléotide (interface NC-NC). SEPT2 se lie à une autre SEPT2 par l'interface NC-NC et à SEPT6 par l'interface G-G. SEPT6 et SEPT7 se lient par l'interface NC-NC et aussi par leurs domaines 'coiled-coil' (Low and Macara, 2006) (**Figure 19**).



**Figure 19: La structure du cristal de l'hétéro-hexamère de septines selon (Sirajuddin et al., 2007)**

### I.IV.B Le modèle octamère de (Kim et al., 2011)

Cette étude avait pour but de voir l'effet, sur la formation des hexamères, de mutations qui déstabilisent l'interface NC-NC entre SEPT6 et SEPT7, ce qui a d'ailleurs confirmé que SEPT6 était bien situé entre SEPT2 et SEPT7. De façon intéressante, ils ont de plus trouvé que les septines pouvaient former des octamères par l'ajout d'un membre du groupe SEPT3 qui se lierait à SEPT7 (Kim et al., 2011), (Sellin et al., 2011) **(Figure 20)**.

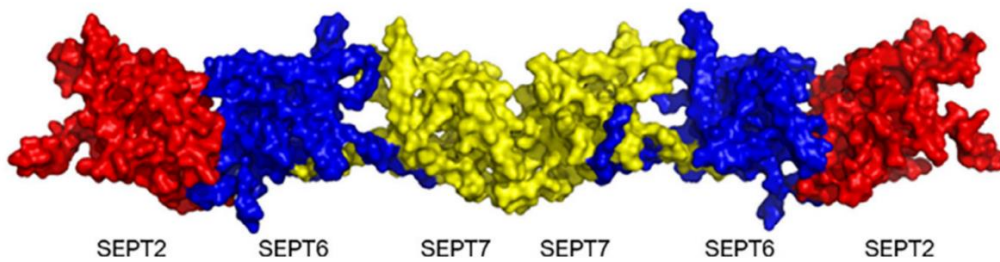


**Figure 20: Illustration de l'hétéro-octamère de septines**

(Fung et al., 2014)

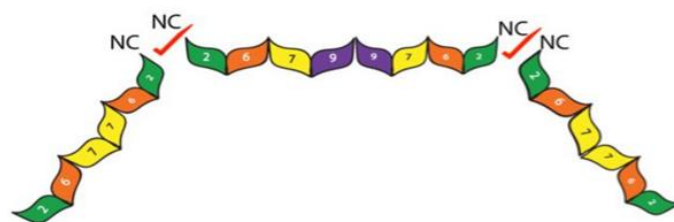
### I.IV.C Repositionnement des septines : Le modèle de (Mendonça et al., 2019) et de (Soroor et al., 2020)

Dans l'étude de (Mendonça et al., 2019), deux représentants du groupe SEPT2 (SEPT2 et SEPT5) ont été exprimés avec SEPT6 et SEPT7 dans *E. coli*. Ils montrent que l'ordre des sous-unités dans l'hétéro-hexamère de septines est complètement inversé par rapport à celui proposé par Sirajuddin et al., 2007 **(Figure 21)**. Comme pour SEPT2, les hexamères formés par la coexpression de SEPT5, SEPT6 et SEPT7 dans *E. coli* présentent un ratio 1 :1 :1 de chaque septine. L'analyse du complexe formé par SEPT5 fusionné au gène qui code MBP, SEPT6 et SEPT7 par microscopie électronique révèle que SEPT5 se trouve aux extrémités de l'oligomère et non pas au centre. Ceci a aussi été confirmé par l'utilisation d'un anticorps anti-SEPT5 utilisé en microscopie électronique. Les expériences, répétées avec SEPT2 à la place de SEPT5, donnèrent les mêmes résultats.



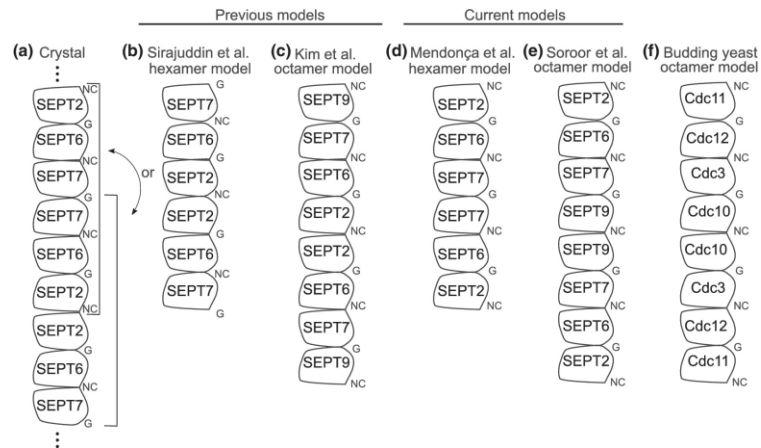
**Figure 21: La structure du cristal de l'hétéro-hexamère de septines selon (Mendonça et al., 2019)**

L'étude de (Soroor et al., 2020) confirme les résultats de (Mendonça et al., 2019). Dans cette étude, ils ont évalué la formation de complexes de septines purifiés de cellules humaines avec SEPT9 complète ou dépourvue de son domaine N-terminal qui affectera alors l'interaction à l'interface NC-NC. Le mutant de SEPT9 a inhibé la formation d'octamères et a induit la formation de tétramères uniquement, indice prouvant qu'il se trouve au centre de l'octamère (**Figure 22**). Quand l'expérience est répétée avec un mutant de SEPT2, ils observent la formation d'hexamères et de tétramères, indiquant que cette septine se trouve aux extrémités. Les hexamères et les octamères ayant des extrémités identiques, ils ont montré qu'ils étaient capables de polymériser entre eux.



**Figure 22: Illustration alternative des hétéro-hexamères et hétéro-octamères où les extrémités sont compatibles pour la polymérisation selon Soroor et al., 2020**

Il est à noter que le modèle de (Mendonça et al., 2019) et de (Soroor et al., 2020) correspond au modèle retrouvé chez la levure (**Figure 23**), pour revue : (McMurray and Thorner, 2019).



**Figure 23: Les différents modèles de polymérisation des septines humaines et de la levure**

*Les anciens et récents modèles de polymérisation des hétéro-oligomères de septines de mammifères.*

(a) Comme décrit dans (Sirajuddin et al., 2007), dans les cristaux formés par un complexe hexamérique de SEPT2, SEPT6 et SEPT7 humaines, l'unité asymétrique était l'hétéro-trimère SEPT2-SEPT6-SEPT7. (b) En se basant sur les résultats de microscopie électronique avec du SEPT2 marqué par du MBP (Maltose Binding Protein), (Sirajuddin et al., 2007) propose un modèle dans lequel SEPT2 forme un homodimère central via l'interface NC. (c) Influencé par les études de (Sirajuddin et al., 2007), (Kim et al., 2011) ont proposé un modèle dans lequel SEPT9 occupe les positions aux extrémités des octamères. (d) La nouvelle étude de (Mendonça et al., 2019) montre une organisation hexamérique différentes dans laquelle SEPT7 forme l'homodimère central. (e) L'étude de (Soroor et al., 2020) montre que l'organisation de l'hétéro-octamère de septines est compatible avec celui déterminé chez la levure où Cdc10, la septine de levure la plus proche de SEPT9, se trouve au centre de l'hétéro-octamère (f).

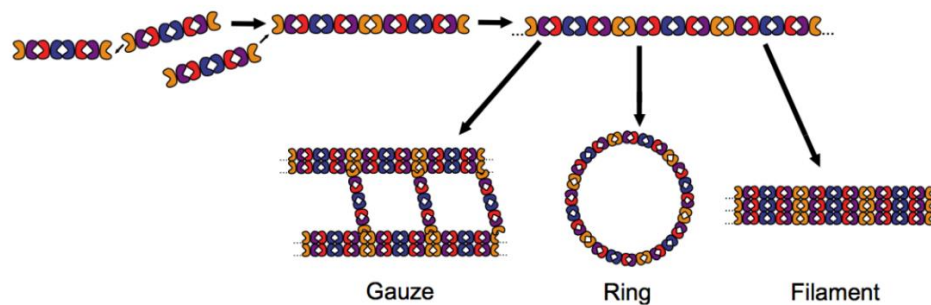
(McMurray and Thorner, 2019).

## I.V L'association en des structures d'ordre supérieur

Les septines interagissent entre elles pour former des hétéro-oligomères. Les interactions entre les extrémités des différents complexes donnent naissance à de long filaments (Sirajuddin et al., 2007) (Soroor et al., 2020), souvent considérés comme les formes fonctionnelles des septines. Les filaments de septines peuvent s'associer en des structures d'ordre supérieur tel que des faisceaux ou des anneaux, provenant des interactions avec les domaines 'coiled-coil' au niveau du C-ter des sous-unités de septines (de Almeida Marques et al., 2012). L'analyse de l'assemblage des septines par microscopie à force atomique montre



que l'assemblage des septines en filaments est favorisé par l'hydrophilie de la surface, les charges négatives de la surface ainsi qu'un pH acide (Jiao et al., 2020) (**Figure 24**).



**Figure 24: Structures d'ordre supérieur des septines**

(Fung et al., 2014)

## I.VI Régulation de l'association des septines en filaments et en structures d'ordre supérieur

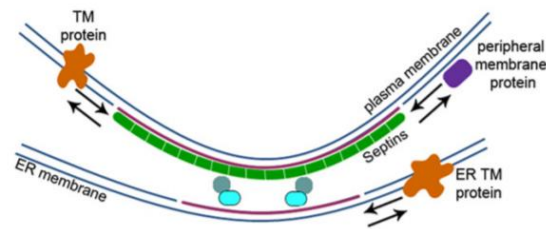
### I.VI.A Le GTP

Le domaine de liaison au GTP permet aux septines de lier et d'hydrolyser le GTP, les vitesses d'hydrolyse étant néanmoins faibles et variables selon les septines (Zent and Wittinghofer, 2014). SEPT6 ne possède pas d'activité GTPase due à l'absence d'une thréonine catalytique au niveau du domaine de liaison au GTP (Sirajuddin et al., 2007). La thréonine équivalente est aussi absente dans Cdc3 et Cdc11 chez la levure (Sirajuddin et al., 2009). Le rôle du GTP dans la formation des filaments de septines, que ce soit juste par sa liaison à son domaine ou par son hydrolyse n'est pas encore bien connu. En effet, l'étude de (Zhang et al., 1999) indique que l'association de SEPT4 à la membrane plasmique via la région polybasique est bloquée par sa liaison au GTP. Par contre, des études plus récentes montrent que le GTP joue un rôle positif dans l'association des structures de septines d'ordre supérieur à la membrane plasmique (Bertin et al., 2010 ; Bridges et al., 2014). L'association des septines au GTP est nécessaire pour les interactions septine-septine. Des mutations au niveau du domaine G de SEPT5 empêche son interaction avec SEPT8 lorsqu'ils sont coexprimés dans les cellules Cos-7 (Martínez et al., 2004). De plus, des mutations du domaine G de SEPT12 réduit son association au GTP, induit la formation d'agrégats de SEPT12 et inhibe son association à SEPT11 dans les cellules HeLa (cancer cervical) (Ding et al., 2008). Le but de l'hydrolyse du GTP reste encore mal décrit mais

une mutation de SEPT11 qui n'empêche pas la liaison du GTP mais son hydrolyse inhibe la formation de filaments de SEPT11 dans les cellules transfectées, ce qui suggère un rôle de l'hydrolyse du GTP dans l'assemblage des septines (Hanai et al., 2004). Chez la levure, Cdc3 et Cdc11 ne sont pas capables d'hydrolyser le GTP, suggérant que l'hydrolyse du GTP n'est pas nécessaire à la formation des filaments mais que le GTP est plutôt présent pour stabiliser les dimères au niveau du complexe de septines (Sirajuddin et al., 2009). Plus récemment, une étude a montré qu'une mutation au niveau du domaine GTP de SEPT7 crucial pour sa dimérisation présente une activité GTPase plus importante que la SEPT7 sauvage, montrant que la dimérisation des septines empêche l'hydrolyse du GTP (Zent and Wittinghofer, 2014).

### I.VI.B La membrane plasmique et les phosphoinositides

L'observation de cellules de levures et de champignons filamenteux par microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) montre que les septines se trouvent en hétéro-octamères ou hétéro-hexamères dans le cytoplasme et ne forment des filaments que lorsqu'ils diffusent au niveau de la membrane plasmique et ceci par un mécanisme appelé 'annealing' (Bridges et al., 2014). Les septines purifiées, même quand elles ne forment qu'un seul oligomère reconnaissent les courbures des membranes (Bridges et al., 2016 ; Cannon et al., 2019) (**Figure 25**) et ceci grâce à une hélice amphipatique se trouvant dans le domaine C-terminal de la septine des levures Cdc12 (Cannon et al., 2019), et qui se trouvent aussi au niveau des septines humaines (Omrane et al., 2019). Plusieurs études montrent que les septines sont sensibles aux courbures de la membrane et qu'elles possèdent plus d'affinité aux courbures positives (Bridges et al., 2016 ; Cannon et al., 2019). Une étude de (Beber et al., 2019) montrent que les septines des levures se lient à des courbures positives et négatives de la membrane mais s'y organisent différemment. Les septines prennent la forme de la courbure négative alors que sur les courbures positives, les septines restent linéaires. La polymérisation des septines est intensifiée en présence d'une monocouche de lipides contenant du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) ou du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) (Bertin et al., 2010 ; Bridges et al., 2016).



**Figure 25: Les septines reconnaissent des courbures de la membrane plasmique de l'ordre du micron**

*Les septines jouent le rôle de barrière de diffusion au niveau de la membrane plasmique et les organelles adjacentes telles que le réticulum endoplasmique chez *S cerevisiae*. TM= transmembrane protein, ER= Endoplasmic Reticulum*

(Bridges and Gladfelter, 2015)

La régulation de la dynamique des filaments de septines peut impliquer des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, la sumoylation, l'acétylation ou l'ubiquitination (Hernández-Rodríguez and Momany, 2012 ; Alonso et al., 2015). Elles ont été majoritairement décrites chez des levures et des champignons filamenteux (Sinha et al., 2007 ; Garcia et al., 2011 ; Meseroll et al., 2013). La sumoylation observée chez les levures et les mammifères, est une modification post-traductionnelle qui contrôle le désassemblage des filaments de septines (Johnson and Blobel, 1999 ; Ribet et al., 2017). La phosphorylation possède un rôle similaire chez la levure (Tang and Reed, 2002 ; Versele and Thorner, 2004). De plus, chez la levure, l'acétylation régule l'association des septines en des structures d'ordre supérieur ainsi que leur stabilisation (Mitchell et al., 2011). L'ubiquitination conduit à la dégradation des septines, et son absence dans le cas de SEPT4 engendre l'accumulation de cette dernière, contribuant à la maladie de Parkinson (Ageta-Ishihara et al., 2013b).

### I.VI.C Auto-régulation

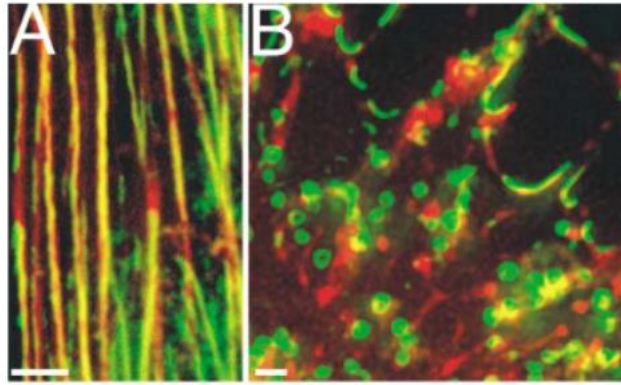
L'association des septines en filaments et structures d'ordre supérieur nécessite des septines intactes. L'acide aminé Q4 (Glutamine) de SEPT2 ainsi que différentes mutations au niveau des interfaces NC et G empêchent l'association de cette septine en complexes (Kim et al., 2012). De plus, chez la levure, la présence de la septine Shs1 est nécessaire pour la formation des anneaux durant le bourgeonnement. En absence de cette septine, ou bien en cas de mutation, les anneaux sont anormaux (Garcia et al., 2011).

#### I.VI.D Les protéines associées aux septines

Plusieurs protéines sont connues pour leurs interactions avec les septines à différentes étapes du cycle cellulaire. Parmi ces protéines, se trouve Bin5 qui se dimérise et régule l'organisation des filaments de septines suite à son association avec Cdc11 chez la levure (Patasi et al., 2015 ; Booth et al., 2016). Plusieurs kinases telles que Gin4 sont aussi connues pour réguler l'association des septines en des structures d'ordre supérieur (Hernández-Rodríguez and Momany, 2012). Les protéines BORG sont des protéines effectrices de Cdc42 qui par leur domaine BD3 (Borg homology domain 3) se lient aux septines à l'interface 'coiled-coil' de l'hétérodimère SEPT6-SEPT7 (Joberty et al., 2001 ; Sheffield et al., 2003). Alors que BORG2 relie les septines à l'actine en interphase (Calvo et al., 2015), la formation et le recrutement des filaments de septines pendant la division cellulaire dépend de la protéine adaptatrice anilline, sans qui les septines diffusent dans le cytoplasme dans les cellules NIH3T3 (Kinoshita et al., 2002) ; chez la levure (Eluère et al., 2012) et chez la drosophile (El Amine et al., 2013). L'anilline se trouve dans la majorité des cellules en interphase au niveau du noyau (Kinoshita et al., 2002), mais cependant elle joue un rôle important dans le recrutement des septines à la myéline dans les oligodendrocytes post-mitotiques (Erwig et al., 2019).

#### I.VI.E Septines, actine et microtubules

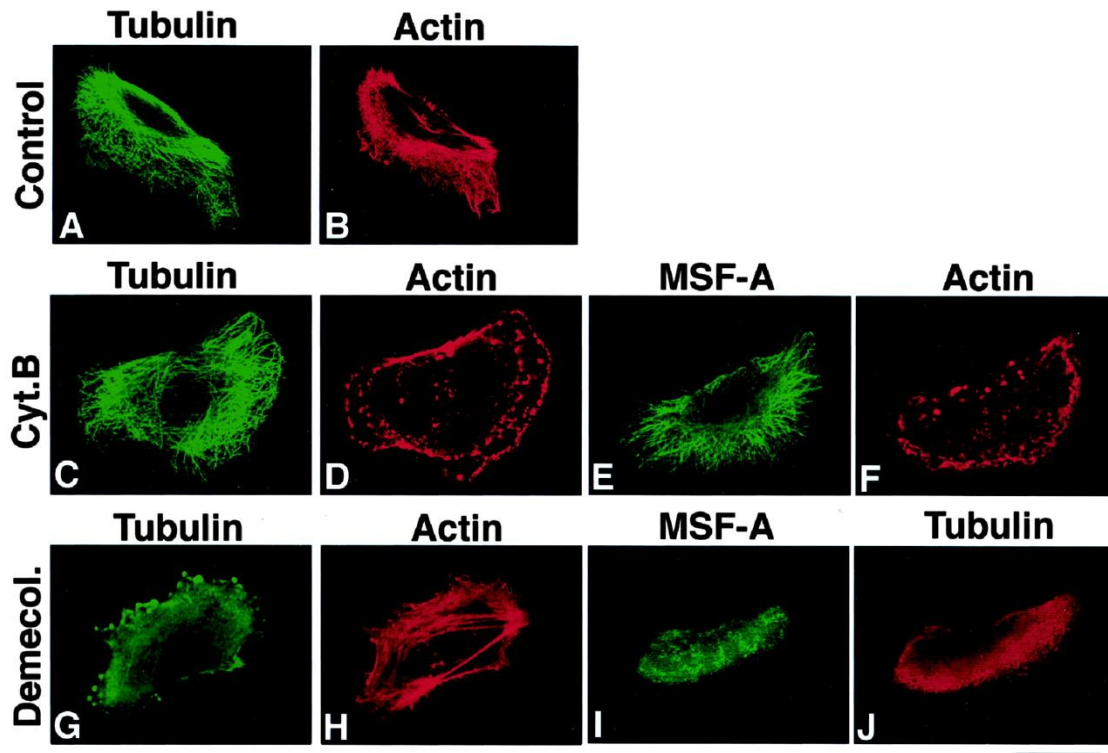
En absence de liaison à l'actine via l'anilline, les septines restent diffuses dans le cytoplasme des cellules NIH3T3 (Kinoshita et al., 2002). De plus, *in-vitro*, les septines ne forment des filaments qu'en présence d'anilline les liant à l'actine. Ces résultats montrent que les septines forment des filaments en utilisant les fibres d'actine comme point d'ancrage grâce à leurs adaptateurs, qui sont des protéines d'association à l'actine (anilline, myosine II et les protéines BORGs) (Kinoshita et al., 2002 ; Joo et al., 2007 ; Calvo et al., 2015). Chez les mammifères, en interphase, quand les microfilaments d'actine sont dépolymérisés par la cytochalasine D, les septines sont retrouvées sous forme d'anneaux de taille constante (Kinoshita et al., 2002) (**Figure 26**). D'une taille et d'une organisation complètement différentes des anneaux de septines observés lors de la cytokinèse, ces anneaux intégrant de la myosine II diffusent librement dans le cytoplasme et ne sont associés à aucun élément du cytosquelette (Joo et al., 2007).



**Figure 26: La formation d'anneaux de septines après dépolymérisation de l'actine par la cytochalasine D dans les fibroblastes NIH3T3**

*(A) Coalignment des filaments de septines (en vert) avec l'actine (en rouge) dans les cellules NIH3T3 non traitées (B) Formation des anneaux de septines (en vert) après 30 min de traitement par la cytochalasine D*  
(Kinoshita et al., 2002)

Le rôle des MTs dans la formation des filaments de septines n'est pas encore connu. Néanmoins, lorsque les septines sont localisées sur les MTs, leur organisation en filaments est perdue après dépolymérisation des MTs par le nocodazole (Surka et al., 2002 ; Nagata et al., 2003 ; Martínez et al., 2006) (**Figure 27**). Aussi, la stabilité des disques de septines localisés sur les MTs circulaires dans les cellules non adhérentes K562 dépend de la présence des MTs puisque la dépolymérisation de ces derniers par le nocodazole ou le froid mène à la perte de ces disques de septines (Sellin et al., 2011). Cependant, aucune étude n'a jamais montré un effet de la dépolymérisation des MTs sur les septines lorsqu'elles colocalisent avec les microfilaments d'actine, comme nous le décrivons dans la dernière partie des résultats de cette thèse.



**Figure 27: Effet de la dépolymérisation de l'actine ou des microtubules sur l'organisation des septines contenant MSF-A (SEPT9) dans les cellules HMEC où elles sont localisées majoritairement sur les MTs dans des conditions basales**

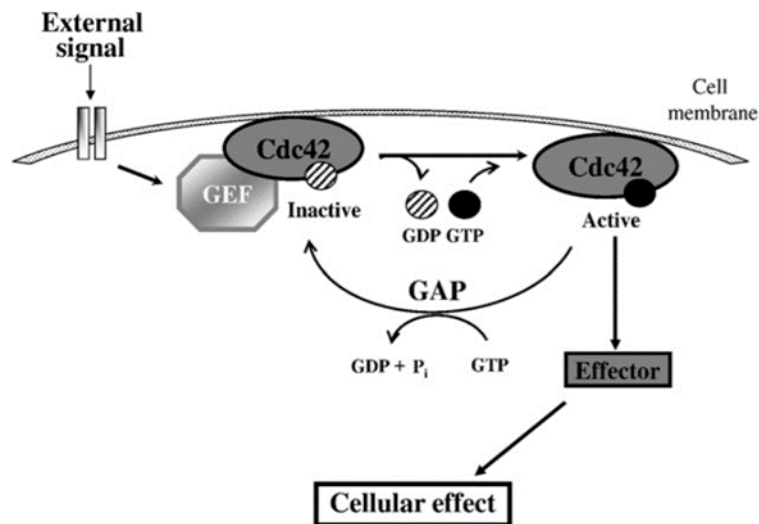
La dépolymérisation de l'actine résulte d'une exposition de 15 minutes à 5  $\mu$ M de cytochalasine B (C–F). La dépolymérisation des MTs résulte d'une exposition de 100 minutes à 37 °C à 10 ng/ml demecolcine (Demecol.) (G–J). La cytochalasine B et la demecolcine ont effectivement dépolymériser l'actine et la tubuline respectivement (A–D, G et H). Les cellules traitées avec la cytochalasine B ont été marquées pour MSF-A (E) et l'actine (F). Les cellules traitées avec de la demecolcine ont été marquées pour MSF-A (I) et tubuline (J).

(Nagata et al., 2003)

#### I.VI.F La GTPase Cdc42

*In vivo*, l'assemblage des septines dans certains évènements cellulaires est régulé par des GTPases telles que Cdc42. Cdc42 appartient à la famille des petites GTPases et est connue pour réguler l'organisation des membres du cytosquelette et du trafic membranaire dans des processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire, la motilité et la cytokinèse (Etienne-Manneville, 2004). En réponse à des signaux externes, l'activation de Cdc42 est régulée par des GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) qui permettent le passage du Cdc42-GDP inactif en Cdc42-GTP actif (Cerione and Zheng, 1996). La liaison de la GEF avec la forme inactive de Cdc42 déstabilise le complexe GDP-Cdc42 permettant ainsi au GTP de

remplacer le GDP. La faible affinité de liaison à Cdc42 permet à la GEF de se dissocier de la protéine une fois qu'elle est activée. Contrairement à l'effet de la GEF, les GAPs (GTPase Activating Proteins) initient l'hydrolyse du GTP associé au Cdc42, le rendant ainsi inactif (Sinha and Yang, 2008) (**Figure 28**).



**Figure 28: Le cycle d'activation et d'inactivation de Cdc42**

*En réponse à un stimuli externe, les GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) se lient à Cdc42 inactif (Cdc42-GDP) ce qui déstabilise la liaison du Cdc42 au GDP. Le GTP abondant dans le cytosol remplace GDP au niveau de Cdc42. Les GEFs ayant une faible affinité au Cdc42 actif (Cdc42-GTP), se détachent. Le Cdc42 actif interagit avec ses effecteurs pour générer des effets cellulaires. Les GAPs (GTPase Activating Proteins) favorisent l'hydrolyse du GTP de Cdc42, ramenant ainsi le Cdc42 à son état inactif.*

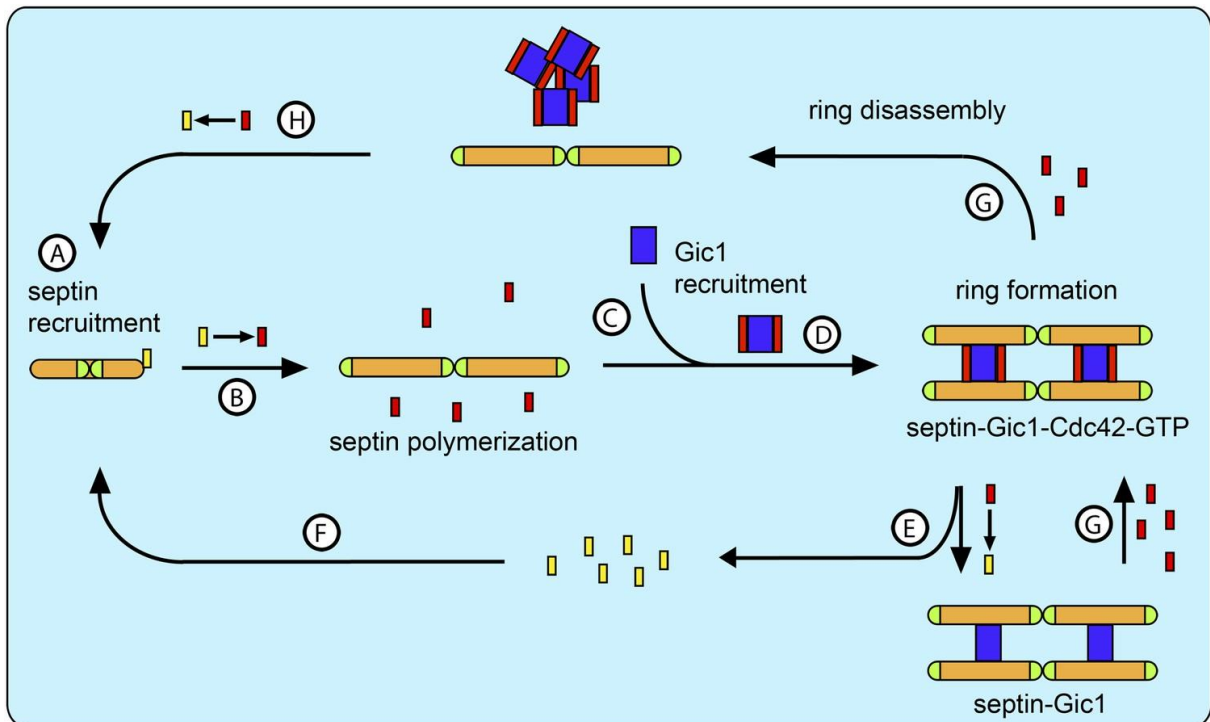
(Sinha and Yang, 2008)

Des études montrent que Cdc42 régule négativement la polymérisation des septines dans les cellules de mammifères. En effet, dans le spermatozoïde de souris, la localisation de Cdc42 au cours de la spermiogenèse est similaire à celle de SEPT12 (Huang et al., 2018). La surexpression de SEPT12 ainsi que de Cdc42 sauvage ou de la forme constitutivement active de Cdc42 (Cdc42-Q61L) dans les cellules 293T diminue la forme polymérisée circulaire attendue des septines et favorise la formation de spots de septines (Huang et al., 2018). L'effet de Cdc42 sur les septines se fait via ses protéines effectrices. Cdc42 régule négativement l'association de ses protéines effectrices BORG aux septines, inhibant ainsi leur polymérisation (Joberty et al., 2001 ; Sheffield et al., 2003).

D'autres études démontrent que c'est l'équilibre entre les formes active et inactive de Cdc42 qui est nécessaire pour remplir les fonctions de régulation de l'organisation des septines. L'étude de (Nölke et al., 2016) montre que les protrusions membranaires microtubulaires formées par les cellules Caco-2 d'adénocarcinome de colon infectées par la bactérie *Clostridium difficile* sont dépendantes des septines. Avant et durant la formation de ces protrusions, Cdc42 est activé. Ce n'est en fait que l'activation persistante de Cdc42 qui transforme les septines sous forme de chevrons en anneaux ce qui inhibe la formation de protrusions.

L'importance de cet équilibre entre les formes active et inactive de Cdc42 sur la localisation des septines a été montrée dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'état d'activation de Cdc42 est essentiel pour le recrutement des septines au niveau du site de bourgeonnement (Iwase et al., 2006 ; Gladfelter et al., 2002). Ce recrutement implique non seulement Cdc42 mais sa protéine effectrice Gic1 qui est considérée comme l'homologue fonctionnelle des protéines BORG humaines (Sadian et al., 2013) (**Figure 29**). Les auteurs proposent que Cdc42 inactif se lie physiquement à la septine de levure Cdc10 et recrute les septines au site de bourgeonnement. L'activation de Cdc42 par sa GEF induit alors son détachement des septines et le recrutement de Gic1 au site de bourgeonnement. Gic1 stabilise les filaments de septines et crée alors des complexes Septines-Gic1-Cdc42-GTP. Durant la division cellulaire, le niveau de Cdc42-GTP augmente en raison d'une abondance plus grande de sa GEF. Ceci mène à la dissociation des septines de Gic1 et la perte des anneaux de septines. L'hydrolyse du GTP de Cdc42 en GDP accentue aussi le désassemblage des filaments de septines et ainsi le recrutement des septines peut recommencer à un autre site initiant un nouveau bourgeonnement. Ceci montre que la présence de la forme active de Cdc42-GTP est nécessaire pour la formation de l'anneau de septines, mais qu'en excès, elle mène à sa dissociation (Sadian et al., 2013).





**Figure 29: Le modèle de recrutement des septines au site de bourgeonnement**

(A) Le Cdc42-GDP (représenté par un rectangle jaune) recrute le complexe de septines au site de bourgeonnement (représenté par les bâtonnets orange. Les extrémités vertes représentent la septine Cdc11). (B) Au niveau du site de bourgeonnement, Cdc24, une GEF de Cdc42, catalyse l'échange nucléotidique de Cdc42 de GDP en GTP (représenté par un rectangle rouge) ce qui recrute l'effecteur Gic1 (représenté par un rectangle bleu). (C) Les septines polymérisent. (D) Gic1 oligomérisse et stabilise les filaments de septines en formant des câbles de septine-Gic1-Cdc42-GTP utilisés pour former l'anneau de septines. (E) Cdc42-GTP n'est pas nécessaire pour la stabilité des câbles et après hydrolyse du GTP, se dissocie du complexe septines-Gic1. (F) Cdc42-GDP recrute plus de complexes de septines au site de bourgeonnement. (G) Pendant la division cellulaire, la concentration locale de Cdc42-GTP augmente par l'augmentation de l'activation de Cdc24. Ceci mène à la dissociation des câbles septines-Gic1-Cdc42-GTP et l'anneau de septines se forme. (H) Après que la GAP de Cdc42 catalyse l'hydrolyse, Cdc42-GDP se lie aux filaments de septines et les désassemble en octamères.

(Sadian et al., 2013)

Par contre, selon (Okada et al., 2013), les septines sont recrutées au bourgeon des levures non pas par la forme inactive Cdc42-GDP comme dans l'étude précédente mais par la forme active Cdc42-GTP, présente au niveau de la membrane du bourgeon. L'appétence des septines pour le Cdc42 actif induirait leur recrutement au site de bourgeonnement mais aussi celui de GAPs, résultant par rétroaction à la production de Cdc42 inactif. Grâce à leur capacité à interagir avec la membrane plasmique, les microfilaments d'actine et les MTs, les septines jouent différents rôles importants dans les cellules en interphase ou en division. Dans la partie

suivante, les modes d'action par lesquels les septines participent à différents processus cellulaires sont décrits.

## II. Les fonctions des septines

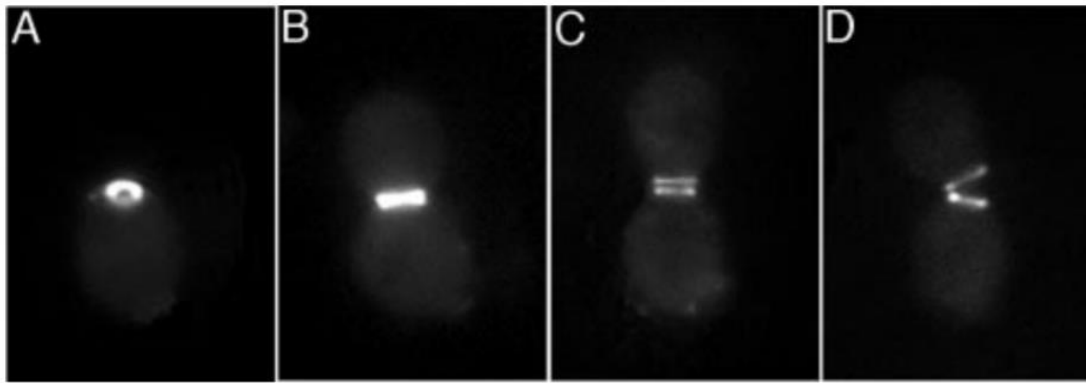
### II.I Les modes d'action au niveau moléculaire

#### II.I.A Barrière de diffusion

Les septines sont capables de maintenir ou de restreindre la présence de protéines dans des compartiments membranaires particuliers, et ce lors de différents processus cellulaires.

#### *Chez la levure*

Le rôle des septines comme barrière de diffusion corticale a été découvert lors de la division cellulaire asymétrique chez *S. cerevisiae*, où l'anneau (en fait l'assemblage d'anneaux) de septines au niveau du cou du bourgeon empêche la diffusion latérale de protéines membranaires spécifiques (**Figure 30**). Durant le bourgeonnement, lorsque l'anneau de septines est intact, la localisation de la protéine Lte1, une GEF (Guanine Exchange Factor), est restreinte à la cellule fille. En effet, des mutations perturbant l'anneau de septines permet à Lte1 de diffuser vers la cellule mère et d'activer la GTPase TEM1 qui favorise l'arrêt prématuré de la division cellulaire (Douglas et al., 2005). De plus, pour améliorer la durée de vie du bourgeon, la barrière de septines empêche l'entrée de facteurs de vieillissement qui restent dans la cellule mère âgée (Shcheprova et al., 2008). Des études plus récentes montrent que l'anneau de septines lors de la division cellulaire est en fait plus proche de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) que de la membrane plasmique (Bertin et al., 2012) et que les septines jouent un rôle de barrière de diffusion pour les protéines du RE (Luedeke et al., 2005) comme It2sp restreinte au niveau du bourgeon (Wolf et al., 2012).



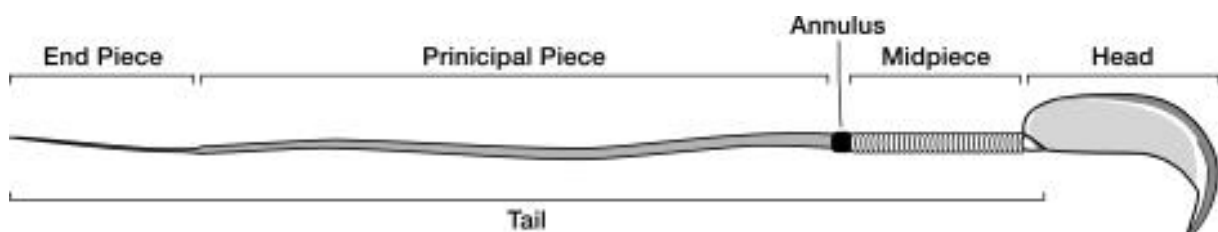
**Figure 30: L'anneaux de septines durant le bourgeonnement de *C. albicans* durant la cytokinèse**

Images prises par microscopie à fluorescence, en observant la fluorescence de Cdc10-GFP. Les cellules représentent : (A) la formation d'anneau (B) les septines au niveau du cou entre la cellule mère et la cellule fille. (C) La scission de l'anneau. (D) la cytokinèse et le désassemblage de l'anneau.

(Douglas et al., 2005)

### Chez les mammifères

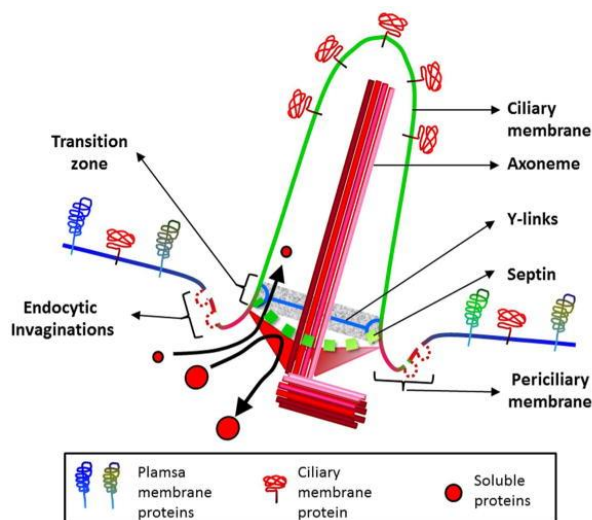
Le rôle des septines comme barrière de diffusion chez les mammifères est décrit lors de la cytokinèse (voir plus bas), au niveau de l'annulus du spermatozoïde, ou encore à la base des cils ou des épines dendritiques. Le spermatozoïde est constitué de 3 parties, la tête, la partie intermédiaire et le flagelle, reliées entre elles par une structure enrichie en septines appelée annulus ou espace annulaire (**Figure 31**). La basigine est une glycoprotéine transmembranaire nécessaire pour la spermatogenèse dont la diffusion varie selon le stade. L'absence de SEPT4 chez la souris mène à la perte de l'annulus et par conséquent à la distribution aléatoire de la basigine (Kwitny et al., 2010).



**Figure 31: Schéma montrant les différentes parties d'un spermatozoïde**

(Kwitny et al., 2010)

Un anneau de septines est également retrouvé à la base des cils primaires et des cils motiles (**Figure 32**), où il joue le rôle de barrière de diffusion.

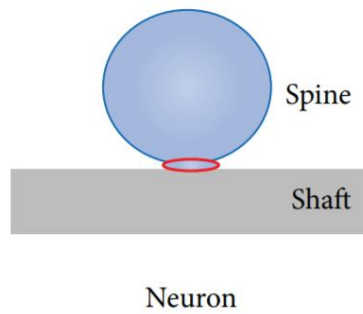


**Figure 32: Schéma d'un cil isolé du cytoplasme grâce à une barrière formée de plusieurs composants dont les septines**

(Madhivanan and Aguilar, 2014)

La déplétion de SEPT2 dans les cellules épithéliales de rein ou dans les fibroblastes d'embryons de souris, induit une diffusion des protéines membranaires entre le cil primaire et le reste de la membrane cellulaire (Hu et al., 2010). De plus, la déplétion de SEPT2 inhibe le recrutement d'un complexe protéique important dans la constitution de la barrière de diffusion du cil primaire (Chih et al., 2011).

Les septines sont également localisées au niveau des épines dendritiques (**Figure 33**), où elles s'associent avec la membrane plasmique.



**Figure 33: Schéma montrant la présence d'un anneau de septines à la base des épines dendritiques**

(Zhang, 2016)

La SEPT7 est reconnue comme régulant les protéines arrivant aux épines dendritiques (Ewers et al., 2014) en formant avec SEPT5 et SEPT11 la barrière de diffusion (Xie et al., 2007).

### II.1.B Echafaudage protéique

Grâce à leur capacité de s'associer à des membranes ou à des éléments du cytosquelette, les septines interagissent avec un grand nombre de protéines et ont souvent été décrites comme jouant le rôle de protéines d'échafaudage.

Chez *S. cerevisiae*, l'anneau contractile au niveau du bourgeon recrute une centaine de protéines (Gladfelter et al., 2001 ; McMurray and Thorner, 2009). Quelques-unes de ces protéines sont des protéines structurales telles que les chitines synthases Chs3 et Chs4 qui s'attachent à l'anneau de septines via Bni4 (Douglas et al., 2005). Leur rôle est de former une paroi cellulaire chitineuse pour assurer l'intégrité du cou du bourgeon pendant sa croissance (Schmidt et al., 2003). D'autres protéines régulent la direction de l'axe de division des cellules telles que Bud3, Bud4 et Axl2/Bud10 (Douglas et al., 2005). Aussi, l'anneau de septines permet d'assurer une cytokinèse normale en recrutant des protéines qui bloquent la kinase Swe1 (ou Wee1), qui fait partie du point de contrôle en G2 (Douglas et al., 2005).

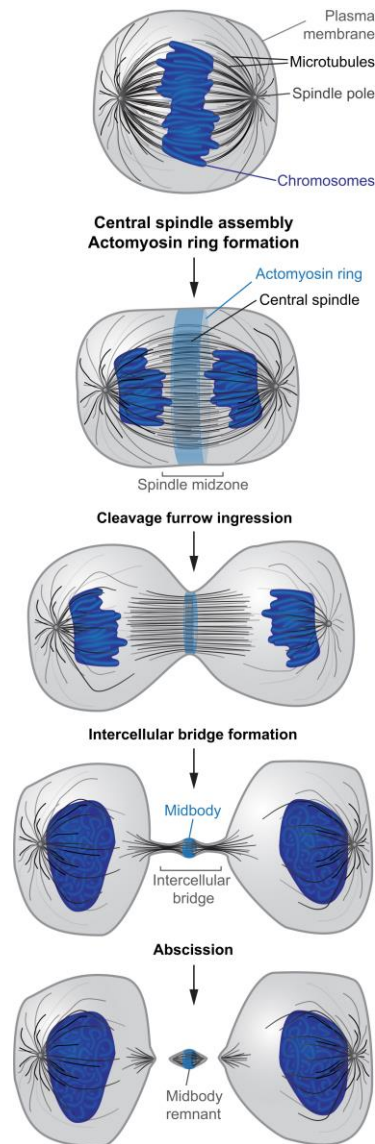
Chez les mammifères, en interphase, pendant la neurogenèse, SEPT7 est nécessaire pour la liaison de la désacétylase HDAC6 sur la  $\alpha$ -tubuline acétylée afin d'exercer sa fonction et diminuer la stabilité des MTs nécessaire dans la neurogenèse (Ageta-Ishihara et al., 2013a). Notre laboratoire a démontré que la présence des septines sur les MTs recrute la protéine de

sauvetage CLIP170 et la kinésine dépolymérisante MCAK afin d'augmenter la dynamique des MTs (Froidevaux-Klipfel et al., 2015).

## II.II L'implication des septines dans différents processus cellulaires

### II.II A La cytokinèse

La cytokinèse commence durant l'anaphase, quand deux chromatides sœurs migrent vers les pôles opposés du fuseau mitotique. La membrane plasmique commence à s'invaginer pour qu'un sillon de clivage puisse séparer les deux cellules filles. Le sillon consiste d'un anneau contractile formé par l'actine la myosine II ainsi que d'autres protéines d'échafaudages telles que l'anilline et les septines. L'anneau à capacité contractile invagine la membrane plasmique pour former le sillon de clivage jusqu'à former le pont intracellulaire avec une structure dense au centre appelée midbody (**Figure 34**). L'abscission, nécessite un remodelage de la membrane plasmique effectué par ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)) ainsi que le désassemblage des MTs au niveau du midbody (Revue : (Fraschini, 2020)).



**Figure 34: Les différentes étapes de la cytokinèse chez les mammifères**

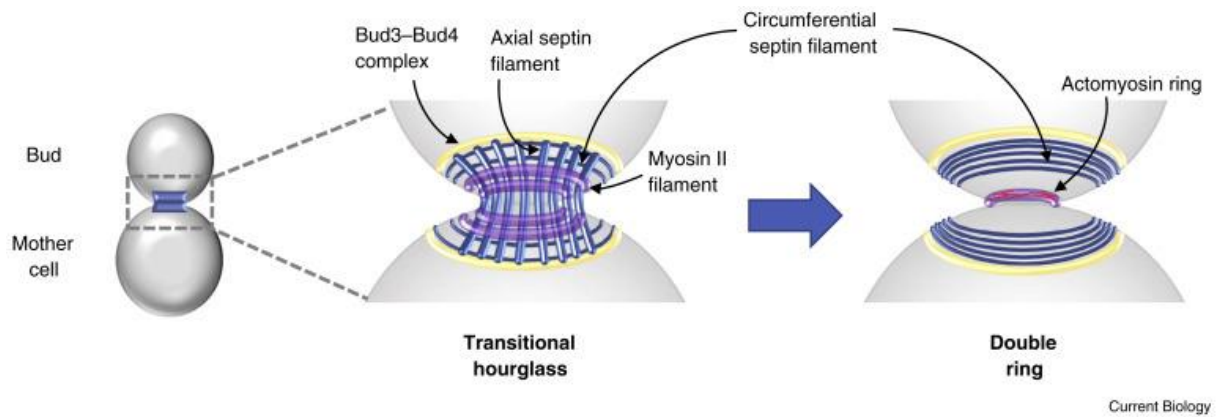
(Mierzwa and Gerlich, 2014)

Au niveau de l'invagination de la membrane plasmique des cellules de mammifères, les septines forment une structure en forme de sablier qui est plus tard remodelée en doubles anneaux durant l'abscission (Kinoshita and Noda, 2001 ; Joo et al., 2005 ; Karasmanis et al., 2019). L'abscission a lieu en présence du complexe ESCRT (Endocytic Sorting Complex Required for Transport) recruté au niveau du midbody. Le recrutement d'ESCRT-I/II vers le midbody des cellules en télophase initie l'assemblage d'ESCRT-III en deux anneaux, qui s'élargissent en hélices et spirales pour bien délimiter le site de l'abscission (Schuh and Audhya, 2014). Le travail de (Karasmanis et al., 2019) montre que SEPT9 en interagissant avec une sous-unité d'ESCRT-I guide le bon recrutement et organisation de sous-unités d'ESCRT II

et III afin de former les anneaux nécessaires pour l'abscission. Les septines 2, 6, 8, 9 et 11 sont localisées au niveau du sillon de clivage en anaphase et au niveau du pont intracellulaire et le midbody en télophase. La déplétion de SEPT2 et SEPT11 n'affecte pas la contraction du sillon de clivage mais plutôt la localisation de la constriction qui se fait du côté des noyaux des deux cellules filles générant ainsi des cellules binucléées. Un phénotype similaire a été observé après la déplétion de l'anilline (Echard et al., 2004). La déplétion de SEPT9 augmente la présence de cellules multinucléées qui ne présentent aucun défaut dans la séparation de l'ADN, la contractilité du sillon de clivage et la formation du midbody. Le défaut était dans l'abscission du midbody (Estey et al., 2010). Chez la drosophile, les septines sont nécessaires pour maintenir l'ancrage de l'anneau contractile au niveau de la membrane et pour permettre la transition de l'anneau contractile au midbody (Founounou et al., 2013). De plus, SEPT2 recrute la myosine II vers le sillon de clivage (Joo et al., 2007) et SEPT7 recrute le moteur moléculaire CENP-E (Centromere protein E) sur les kinétochores nécessaire pour la bonne ségrégation des chromosomes (Zhu et al., 2008).

Chez *S.cerevisiae*, la mise en place de la structure en forme de sablier et sa maturation vers un double anneau est régulée par la GEF de Cdc42, Bud3 (Kang et al., 2014), et par une protéine ressemblant à l'anilline, Bud4 (Wloka et al., 2011). En effet, la forme primaire de la structure en forme sablier est formée de filaments circonférentiels de septines ainsi que des axiaux orientés le long de l'axe mère-bourgeon (**Figure 35, Circumferential septin filaments**). Lors de la cytokinèse, les filaments axiaux se désassemblent pour se réassembler en filaments circonférentiels additionnels (**Figure 35, axial septin filament**), formant le double anneau. Cette transition de la forme en sablier vers le double anneau dépend de Bud3 et Bud4 (Chen et al., 2020), ainsi que de la signalisation par MEN (Mitotic Exit Network) (Tamborrini et al., 2018).



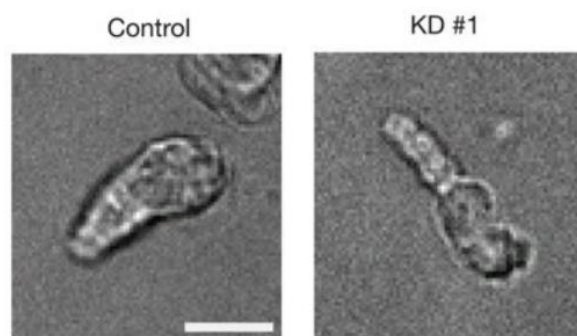


**Figure 35: La transition des filaments de septines, de la structure en forme de sablier en double anneaux chez la levure**

(Piatti, 2020)

### II.II.B La régulation de la rigidité corticale

Les septines contribuent à la maintenance et à la régulation de la forme des cellules, ainsi qu'à leur motilité (Kremer et al., 2007 ; Tooley et al., 2009 ; Gilden et al., 2012). L'absence de SEPT2 ou de SEPT11 induit la diminution de la rigidité et de l'élasticité des cellules HeLa (Mostowy et al., 2011). L'absence de SEPT7 dans les cellules T amiboïdes de souris induit une absence de rigidité cellulaire ainsi que la formation de protrusions supplémentaires, ce qui leur permet de passer à travers des ouvertures étroites dans des Transwell® (Tooley et al., 2009) (**Figure 36**).



**Figure 36: Changement de la conformation cellulaire des cellules T après un knockdown de SEPT7 (KD#1)**

Barre d'échelle = 10  $\mu$ M

(Tooley et al., 2009)

### II.II.C Le trafic vésiculaire

L'exocyste est un complexe octamérique responsable de l'acheminement de vésicules générées par l'appareil de Golgi à leurs sites cibles dans le système nerveux des mammifères (TerBush et al., 1996). Les septines (SEPT2, SEPT4, SEPT6 et SEPT7) du cerveau de rat co-immunoprécipitent avec Sec8, un composant de l'exocyste (Hsu et al., 1998). De plus, dans les cellules épithéliales MDCK, SEPT2 colocalise avec des faisceaux de MTs polyglutamylés et est nécessaire pour le transport des vésicules de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Spiliotis et al., 2008). Les septines forment aussi un complexe avec la syntaxine, une protéine membranaire impliquée dans l'exocytose. Grâce à ce partenaire, les septines régulent l'exocytose et empêchent des événements de fusion non voulus (Yang et al., 2010).

### II.II.D Stabilisation de protéines

Les septines sont capables, par l'interaction avec certaines protéines de les stabiliser et d'éviter leur dégradation. En effet, SEPT9 diminue la dégradation dépendante de l'ubiquitination de plusieurs protéines membranaires telles que EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) en inhibant la liaison de la protéine CIN85 à l'ubiquitine ligase CBL (Diesenberg et al., 2015), et Erb2 (Marcus et al., 2016). SEPT9 stabilise aussi d'autres protéines de signalisation comme JNK ce qui mène à une augmentation de la prolifération (Gonzalez et al., 2009) et participe à la translocation nucléaire de HIF-1 $\alpha$  impliquée dans l'angiogenèse (Amir et al., 2009).

### II.II.E La migration cellulaire

En interagissant avec les autres membres du cytosquelette (Interaction détaillée dans la partie suivante), les septines jouent un rôle dans la migration cellulaire.

La déplétion de SEPT2 ou de SEPT7 inhibe la migration cellulaire des cellules du cancer du sein MDA-MB 231 (Zhang et al., 2016). La migration des cellules de cancer du sein, MCF-7 et MDA-MB 231, est aussi accentuée par la surexpression de SEPT9 (Connolly et al., 2011). SEPT9 contribue à la migration cellulaire en augmentant la capacité de la cellule à dégrader la matrice extracellulaire en sécrétant des protéases MMP (Matrix Metallo Protease) dans le milieu de culture (Marcus et al., 2019). De plus, SEPT9 est surexprimée dans les cellules du rein qui

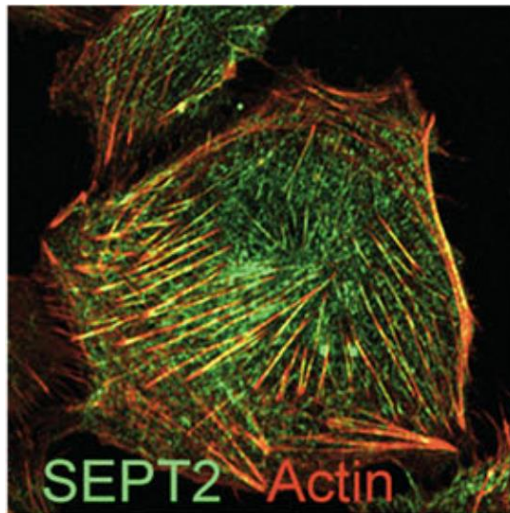
subissent la transition épithélio-mésenchymateuse, et est retrouvée associée avec les fibres de stress au niveau du front de migration de ces cellules (Dolat et al., 2014b).

De plus, l'absence de SEPT14 ou de SEPT4 inhibe la migration des neurones corticaux (Shinoda et al., 2010). Dans *C. elegans*, des mutations dans les gènes *unc-59* et *unc-61* codant pour des membres de la famille des septines affecte la migration des neuroblastes post-embryonniques (Finger et al., 2003).

### II.III L'interrelation avec les autres membres du cytosquelette

#### II.III.A Septines et Actine

Depuis leur découverte, les septines sont connues pour être majoritairement liées à l'actine dans les cellules de mammifères en interphase. La localisation de SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT7 et SEPT9 a été détectée au niveau de l'actine dans plusieurs études (Joberty et al., 2001), (Kinoshita et al., 1997 ; Xie et al., 1999 ; Surka et al., 2002). On les retrouve principalement au niveau des fibres de stress (Hanai et al., 2004 ; Joo et al., 2007 ; Kremer et al., 2007 ; Dolat et al., 2014b ; Calvo et al., 2015) et, dans quelques cas, au niveau des lamellipodes et pseudopodes (Xie et al., 1999 ; Shankar et al., 2010 ; Mizutani et al., 2013). Les septines ne décorent qu'une partie des fibres de stress, puisqu'elles ne recouvrent pas la totalité de la longueur (Kinoshita et al., 2002 ; Joo et al., 2007 ; Targa et al., 2019) (**Figure 37**), et possèdent des préférences pour les fibres de stress de type ventral et pour les arcs transversaux pendant la migration (Hanai et al., 2004 ; Joo et al., 2007 ; Dolat et al., 2014b ; Calvo et al., 2015). L'absence d'interaction des septines avec les fibres de stress induit la perte de ces dernières (Joo et al., 2007), et inversement, en absence d'actine, les septines forment des anneaux (à ne pas confondre avec ceux formés lors de la mitose) qui diffusent librement dans le cytoplasme.



**Figure 37: Colocalisation des filaments de septines et d'actine dans les cellules HHL16 en interphase**

*Il est à noter que les septines ne sont jamais présentes aux extrémités des fibres de stress. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m*

(Targa et al., 2019)

En interphase, les septines se lient à l'actine par la myosine II (Joo et al., 2007 ; Mostowy et al., 2010). BORG2, une protéine effectrice de Cdc42, joue aussi le rôle de lien entre les filaments de septines et les fibres d'actine en interphase (Calvo et al., 2015). Des études récentes faites *in vitro* montrent que les septines peuvent également interagir directement avec l'actine. En effet, des expériences de cosédimentation chez la drosophile montre que les septines de cette espèce interagissent avec l'actine, avec des affinités comparables aux protéines déjà connues pour lier l'actine. De plus, la polymérisation *in vitro* de l'actine en présence du complexe humain SEPT2-SEPT6-SEPT7 induit la formation de microfilaments d'actine, qui sont recouverts par endroits par les septines (Mavrakis et al., 2014). L'équipe de (Smith et al., 2015) montre que SEPT9\_i1 peut se lier directement à l'actine par son domaine N-terminal et ainsi rentrer en compétition avec d'autres protéines liant l'actine telles que la cofiline ou la myosine V. Les septines ont donc un effet sur l'organisation de l'actine, soit par leur liaison directe, soit par leur liaison à des protéines associées.

Les septines jouent un rôle important dans l'organisation et le fonctionnement des fibres de stress. En effet, une déplétion de septines mène à la perte de ces fibres (Mostowy et al., 2011 ; Calvo et al., 2015 ; Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Farrugia et al., 2020). Les septines sont aussi impliquées dans la maintenance d'un réseau d'actine périnucléaire. Sur le côté ventral du

noyau, les septines forment un réseau dense de filaments qui colocalisent avec l'actine (Calvo et al., 2015 ; Kinoshita et al., 2002).

Le rôle des septines au niveau des lamellipodes et pseudopodes n'est pas encore bien connu. Au niveau des lamellipodes, SEPT1 et SEPT5 participent à la migration des cellules de carcinome (Mizutani et al., 2013). Dans l'axone des neurones sensoriels, SEPT6 et SEPT7 se trouvent au niveau des filopodes et induisent la polymérisation de l'actine au niveau de cette structure (Hu et al., 2012).

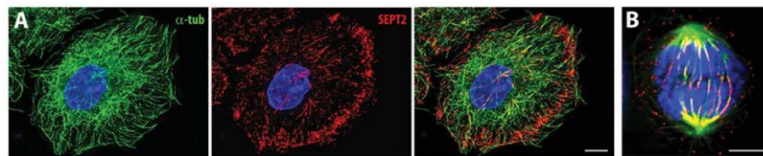
Dans les cellules en mitose, les septines ont été localisées au niveau du sillon de clivage et au niveau de l'anneau contractile constitué de faisceaux d'actomyosine (Kinoshita et al., 1997 ; Kinoshita and Noda, 2001 ; Joo et al., 2007 ; Estey et al., 2010). Durant la cytokinèse, c'est l'anilline qui connecte les septines à l'actine (Kinoshita et al., 1997 ; Kinoshita et al., 2002). La perturbation des filaments de septines par l'expression de la forme mutée d'anilline au niveau du C-ter dans la région de liaison aux septines mène à la perte des fibres de stress (Kinoshita et al., 1997 ; Kinoshita et al., 2002), accentuant le rôle de la liaison des septines à l'actine dans le maintien du réseau d'actine. Durant la division cellulaire, les septines jouent un rôle important dans l'organisation et le positionnement de l'anneau d'actomyosine : Chez la drosophile, les septines regroupent les filaments d'actine en anneau (Mavrakis et al., 2014). De plus, le knockdown de SEPT2, SEPT7 ou SEPT11 perturbe l'ingression du sillon de clivage qui est incapable de se fermer complètement (Joo et al., 2007 ; Spiliotis et al., 2005 ; Estey et al., 2010). Les septines ont été également localisées sous forme de doubles anneaux durant l'abscission, flanquant le centre du midbody en cours de développement. Elles jouent un rôle important dans le recrutement de la machinerie ESCRT. En effet, les septines délimitent le site de l'assemblage d'ESCRT-III en des anneaux. Les septines se désassemblent avant que les anneaux d'ESCRT-III s'élargissent en hélices et spirales (Karasmanis et al., 2019).

### II.III.B Septines et Microtubules

Les septines sont capables d'interagir avec les MTs dans différentes lignées cellulaires de mammifères à différents moments du cycle cellulaire. En interphase, SEPT2 colocalise avec les MTs stables de MDCK (Spiliotis et al., 2008). Il en est de même pour SEPT9 (Surka et al., 2002 ; Nagata et al., 2003), et SEPT11 (Hanai et al., 2004) dans les cellules HMEC et HeLa. De plus,

SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT9 et SEPT11 interagissent avec les MTs des extraits du cerveau de rat (Sakamoto et al., 2008).

Chez les MDCK, l'association des septines avec les MTs est restreinte à des régions particulières, telles qu'aux alentours du noyau et en périphérie cellulaire (Spiliotis, 2010) (**Figure 38**). Les filaments de septines en région périnucléaire sont longs et épais et colocalisent avec des faisceaux de MTs, alors que les filaments de septines en périphérie de cellule sont plus courts et moins épais et colocalisent avec les extrémités des MTs (Bowen et al., 2011). Les filaments de septines semblent avoir une préférence pour les MTs organisés en faisceaux, et un traitement avec du paclitaxel, un agent anticancéreux dont le mécanisme est d'induire la mort cellulaire par la stabilisation des MTs, augmente le recrutement des filaments de septines sur ces bundles (Bowen et al., 2011). Cette idée a été confirmée par l'étude de (Sellin et al., 2012) qui montre que, dans les cellules non-adhérentes K562, les septines endogènes ne précipitent avec les MTs que si les cellules ont été préalablement traitées par du paclitaxel, illustrant aussi l'affinité des septines pour les bundles de MTs.



**Figure 38: Coalignment des septines des cellules MDCK avec les microtubules en interphase (A) et en mitose (B)**

*Images par microscopie confocale. Barre d'échelle = 5  $\mu$ M*

(Spiliotis, 2010)

Les filaments de septines ont aussi été observés au niveau des MTs nucléés par l'appareil de Golgi dans les cellules MDCK (Spiliotis et al., 2008) (**Figure 39**).



**Figure 39: Colocalization des septines chez les MDCK avec les MTs nucléés par l'appareil de Golgi, détecté par la protéine résidente Furine**

*Images confocales rendues en 3D. Barre d'échelle = 5  $\mu$ M*

(Spiliotis et al., 2008)

Durant la mitose, SEPT2 et SEPT6 se trouvent au niveau du fuseau mitotique des cellules HeLa et MDCK (Spiliotis et al., 2005) et SEPT9 a été retrouvée au niveau du fuseau mitotique des cellules HMEC et HeLa (Surka et al., 2002 ; Nagata et al., 2003). De plus, les septines ont été également localisées au niveau de segments de microtubules distaux par rapport au midbody (Karasmanis et al., 2019).

L'interaction entre septines et MTs n'est pas encore bien connue. Il a été montré que SEPT9\_i3 interagit directement avec les MTs via la région centrale de la protéine qui contient le domaine de liaison au GTP (Nagata et al., 2003). L'interaction de SEPT9 avec les MTs, également par le domaine de liaison au GTP, a aussi été prouvé *in vitro* (Nakos et al., 2019b). Même si les septines endogènes des cellules K562 ne précipitent avec les MTs que suite à un traitement par du paclitaxel, une interaction entre septines et MTs peut avoir lieu en absence de paclitaxel, et dépend du domaine N-terminal de SEPT9. En effet, cette association n'a lieu que si l'isoforme abondante de SEPT9 est l'isoforme longue, la SEPT9\_i1 et non pas les isoformes courtes telles que SEPT9\_i4 et SEPT9\_i5, qui possèdent un court domaine N-terminal (Sellin et al., 2012). L'étude de l'interaction de SEPT9 avec les MTs dans des cas d'amyotrophie névralgique héréditaire montre que le domaine N-ter de SEPT9 contient des motifs répétés K/R-x-x-E/D et R/K-R-x-E, qui se lient aux queues C-ter acides de  $\beta$ -tubuline (Bai et al., 2013). Ces charges positives des isoformes longues de SEPT9 seraient attirées par les charges négatives en partie C-terminale des MTs, (Spiliotis et al., 2008 ; Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Le complexe de septines 2/6/7 présente une légère préférence pour la tubuline-GTP et rentre en compétition avec EB1 (End-Binding protein 1) pour la liaison aux MTs GTP $\gamma$ S stabilisés (Nakos et al., 2019a).

La modulation d'expression (surexpression ou inhibition) des septines affectent la dynamique des MTs et leurs modifications post-traductionnelles. Les MTs des cellules HeLa dépourvues de SEPT7 résistent à la dépolymérisation par le nocodazole en raison de l'accumulation de tubulines acétylées (marqueur de la stabilité des MTs) (Kremer et al., 2005 ; Janke and Montagnac, 2017). La même observation a été faite quand SEPT9\_i3 est inhibée (Nagata et al., 2003). Par contre, la surexpression de SEPT9\_i4 induit une résistance des MTs à la stabilisation par le paclitaxel (Chacko et al., 2012). Une étude récente de (Nakos et al., 2019b) montre que, *in vitro*, des concentrations de SEPT9 de l'ordre du micromolaire inhibent le

phénomène de catastrophe des MTs et favorisent la croissance des bouts plus. SEPT9 recrute de la tubuline soluble sur la lattice du MT grâce à son domaine de liaison au GTP. Cette même équipe montre qu'alors, de faibles concentrations du complexe SEPT2/6/7 favorisent la croissance des MTs (Bowen et al., 2011), de plus fortes concentrations, en régulant l'association de la protéine EB1 aux MTs, induisent au contraire des événements de pause (Nakos et al., 2019a). Les cellules de cancer du sein MDA-MB 231 rendues résistantes au paclitaxel présentent une surexpression des septines 2, 7, 8, 9 (plus spécifiquement SEPT9\_i1) et 11, ce qui permet de maintenir une dynamique microtubulaire et ainsi de contrecarrer l'effet stabilisateur du paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Une résistance au paclitaxel en lien avec une surexpression de SEPT9\_i1 a aussi été observée par (Amir and Mabeesh, 2007). La surexpression des septines dont obligatoirement celle de SEPT9\_i1, surtout si elle est associée à celle des enzymes responsables de la polyglutamylolation des MTs, induit une résistance au paclitaxel dans différentes lignées cellulaires sensibles (Targa et al., 2019).

L'effet des septines sur la dynamique microtubulaire est aussi dû à leurs interactions avec les protéines associées aux MTs (MAPs). Selon (Kremer et al., 2005), SEPT2 peut affecter la dynamique des MTs de par son interaction avec MAP4, une protéine associée stabilisatrice des MTs. En effet, le monomère de SEPT2 ou SEPT2 au sein du complexe SEPT2/6/7 est capable de se lier à MAP4 empêchant ainsi sa liaison aux MTs et donc diminuant la stabilité de ces derniers. Mais selon (Spiliotis et al., 2008), les septines s'associent plutôt aux MTs et entrent en compétition avec MAP4 pour un même site de liaison. Dans les enchevêtrements neurofibrillaires, les septines colocalisent avec une autre MAP stabilisatrice, la protéine tau et une interaction entre les septines et tau a été proposée (Kinoshita et al., 1998). Les études au laboratoire de (Froidevaux-Klipfel et al., 2015) puis de (Targa et al., 2019) montrent que le recrutement des septines sur les MTs suite à un traitement au long cours ou en aigu par du paclitaxel aide au maintien d'une dynamique microtubulaire en recrutant des MAPs telles que le facteur de sauvetage CLIP-170 et la kinésine dépolymérisante MCAK permettant ainsi de résister à l'effet stabilisateur du paclitaxel.

Les septines sont capables d'interagir avec des moteurs moléculaires marchant sur le MT. L'interaction de SEPT2 avec la kinésine 7, en métaphase, en est un exemple. Cette interaction aide à la motilité de la kinésine 7 sur les MTs pour le bon alignement et la bonne ségrégation des chromosomes (Spiliotis et al., 2005). Le complexe SEPT2/6/7 se lie à la kinésine 7 par le



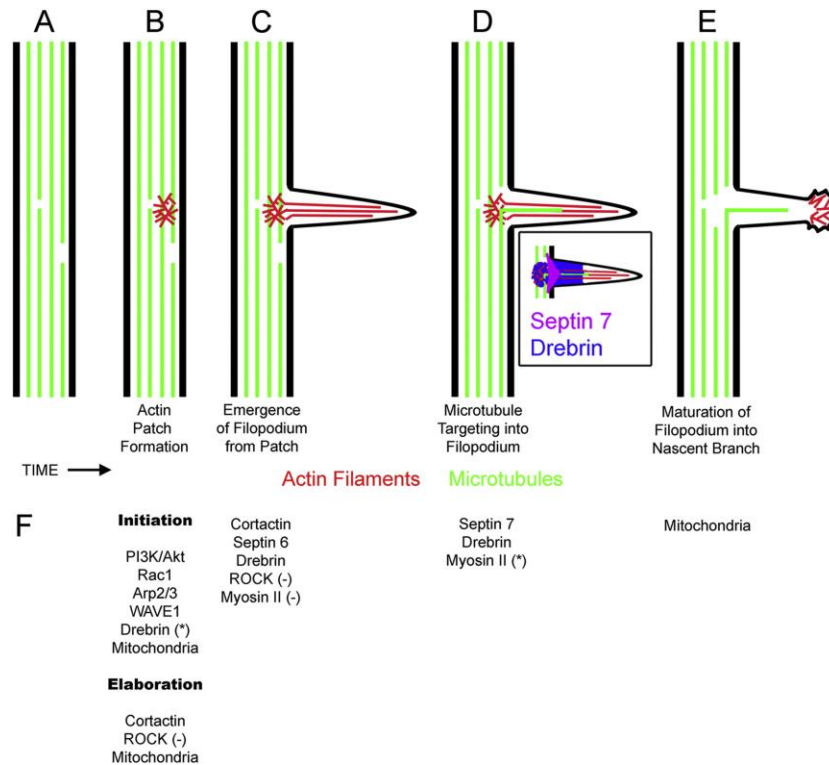
domaine C-ter de SEPT7 (Zhu et al., 2008). De plus, la présence de SEPT2 dans les épithéliums polarisants est nécessaire pour le transport des vésicules provenant de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique, sans qu'une kinésine particulière ait été impliquée (Spiliotis et al., 2008).

### III. Septines et pathologies

En raison de leur implication dans une large variété de processus cellulaires, un nombre grandissant d'études montre que les septines jouent un rôle dans le développement et la physiologie de certains tissus et organes (Dolat et al., 2014a). Une aberration de leur expression, de leur interaction avec des partenaires, ou de leur localisation subcellulaire dans certains tissus contribuera au développement de pathologies humaines, telles, par exemple, les maladies neurodégénératives ou les cancers.

#### III.I Les maladies neurodégénératives

Le bon fonctionnement d'un système nerveux requiert la formation d'un réseau interconnecté ainsi, pendant le développement, les neurones forment des contacts synaptiques avec plusieurs cibles via le branchement de leurs axones (Revue : (Armijo-Weingart and Gallo, 2017)). Les branchements peuvent se former de la division du cône de croissance (Sainath and Granato, 2013) ou en émergent des filopodes et lamellipodes se trouvant le long de l'axone, indépendamment du cône de croissance, ce qui est appelé : les branchements collatéraux des axones (Armijo-Weingart and Gallo, 2017). Les septines se trouvent à la base de ces branchements et contrôlent via leur interaction avec l'actine et les MTs leur initiation et maturation (Hu et al., 2012) (**Figure 40**).



**Figure 40: Schéma représentant les événements et les régulateurs impliqués dans les branchements collatéraux des axones**

(Armijo-Weingart and Gallo, 2017)

SEPT6, accentue la transition des patches de F-actine (**Figure 40.B**) en filopodes en augmentant le recrutement de cortactine, une protéine activatrice de la polymérisation de l'actine par Arp2/3 (Hu et al., 2012) (**Figure 40.C**). SEPT7 est responsable de l'entrée des MTs dans le branchement (**Figure 40.D**). Ainsi, une perturbation au niveau des septines engendrerait des problèmes dans l'initiation et la maturation des branchements collatéraux axonaux et donc le bon fonctionnement du système nerveux.

Les septines jouent également un rôle dans l'arborisation dendritique. Elles se trouvent au niveau de la base des épines dendritiques neuronales afin d'exercer leur rôle de barrière de diffusion (Caudron and Barral, 2009). La déplétion de SEPT6, 7 ou 11 induit une diminution de l'arborisation dendritique ainsi que sa morphologie (Tada et al., 2007 ; Xie et al., 2007 ; Cho et al., 2011).

Pendant la corticogenèse, les neurones post-mitotiques générés au niveau de la zone ventriculaire migrent vers les couches superficielles du cortex. L'absence de SEPT14 ou de SEPT4, qui normalement sont fortement exprimées dans le cortex en développement, ainsi

que l'absence d'interaction entre eux, inhibe la migration neuronale vers les couches superficielles du cortex (Shinoda et al., 2010). La perturbation de la migration de ces neurones a été observée dans plusieurs maladies telles que le retard mental et l'épilepsie (Clark, 2002).

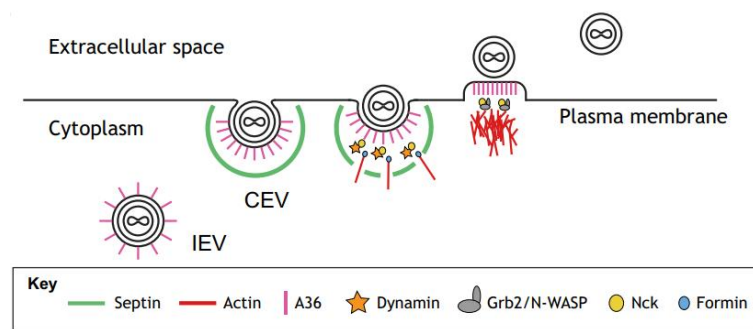
Les septines sont également impliquées dans les synapses chimiques à différents moments. Elle peuvent se trouver au niveau de la fente présynaptique (Tsang et al., 2011), être impliquées dans la fusion de la vésicule synaptique : SEPT8 participe à la formation du complexe SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) (Ito et al., 2009) ; ou même inhiber la fusion synaptique : SEPT5 et SEPT7 inhibent la formation du complexe SNARE (Beites et al., 2005 ; Wasik et al., 2012).

Vu leurs différents rôles dans le fonctionnement du système nerveux ; les dérégulations des septines ont été détectées dans différentes maladies neurodégénératives telles que la schizophrénie (Pennington et al., 2008), les maladies d'Alzheimer (Takehashi et al., 2004) ; et de parkinson (Ageta-Ishihara et al., 2013b).

### III.II Infection virale/bactérienne

Le virus de la vaccine est la cause de la maladie infectieuse des bovidés et des équidés, utilisé dans les vaccins pour immuniser contre la variole (Walsh and Dolin, 2011). Une fois dans la cellule, le virus répliqué s'enveloppe par deux membranes (IEV=intracellular enveloped virus) (**Figure 41**) et est transporté vers la membrane plasmique par la kinesine-1 (Leite and Way, 2015). A la surface cellulaire, l'enveloppe externe du IEV fusionne avec la membrane plasmique (Arakawa et al., 2007) afin de libérer le virus. Cependant, pas tous les virus ne sont libérés et quelques-uns restent attachés à la membrane plasmique : un phénotype nommé CEV (cell-associated enveloped virus) (Leite and Way, 2015) (**Figure 41**). A ce moment, les septines sont recrutées au CEV afin de former une barrière et inhiber la dissémination du virus vers les cellules adjacentes. En effet, une déplétion de SEPT2, SEPT7, SEPT9 ou SEPT11 augmente la dissémination du virus (Pfanzer et al., 2018). Afin de s'en débarrasser, le virus active une voie de signalisation induisant la polymérisation de l'actine nécessaire pour sa dissémination. Les tyrosines kinases Src/Abl phosphorylent la protéine virale transmembranaire A36 au niveau des résidus tyrosine 112 et tyrosine 132. Ceci recrute NCK 1 et 2, WIP et N-WASP ainsi que Grb2 pour stabiliser ces dernières afin d'induire la polymérisation de l'actine dépendante d'Arp2/3, formine et dynamine. NCK, est nécessaire et

suffisante pour détacher les septines en recrutant dynamine et formine pour la polymérisation de l'actine (Pfanzelter et al., 2018).

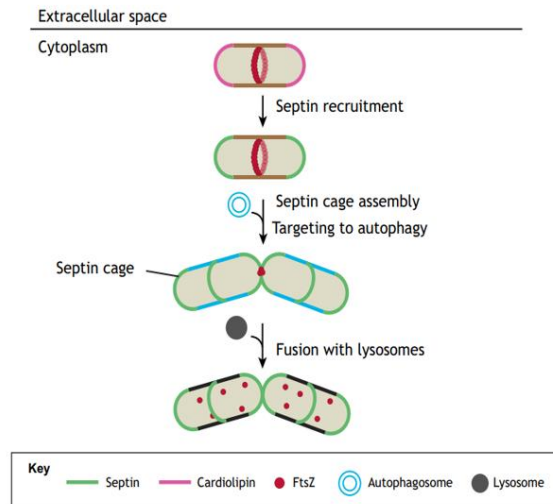


**Figure 41: Le rôle des septines dans la prévention de la dissémination du virus de la vaccine**

*Pendant la sortie du virus (IEV= Intracellular Enveloped Virus), les septines sont recrutées vers ce dernier immédiatement après sa fusion avec la membrane plasmique (CEV= Cell-associated Enveloped Virus). Les septines forment des structures qui ressemblent aux anneaux pour piéger les virus et induire la polymérisation de l'actine. Dynamine, recrutée par Nck ainsi que la polymérisation de l'actine médiée par formine détachent les septines du virus.*

(Van Ngo and Mostowy, 2019)

Les septines, en formant une cage, empêche la division cellulaire de la bactérie *Shigella flexneri* responsable de la maladie endémique de Shigellose. Les septines reconnaissent les courbures de bactérie en division générée par un anneau contractile formé par la protéine FtsZ et reconnaissent les lipides enrichis à la surface des bactéries en division : les cardiolipines. En formant des cages, les septines recrutent la machinerie de l'autophagie et la délivrance des lysosomes (Krokowski et al., 2018) **(Figure 42)**.



**Figure 42: Le rôle des septines dans l'inhibition de la division de la bactérie *Shigella flexneri***

*Les septines sont recrutées sur des courbures à l'échelle du micromètre se trouvant dans les cellules de *Shigella* en division dans le cytoplasme. Le recrutement des septines est induit par la cardiolipine enrichies à ces régions. Les septines s'assemblent sous forme de cages autour de *Shigella* en cours de croissance pour inhiber sa division cellulaire en induisant l'autophagie et la fusion avec le lysosome.*

(Van Ngo and Mostowy, 2019)

### III.III Les cancers

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle des septines dans le cancer, et plus précisément dans l'acquisition de la résistance au paclitaxel. Le niveau d'expression de certaines isoformes de septines mais aussi leurs interactions avec d'autres protéines partenaires sont autant de facteurs qui ont été retrouvés impliqués dans la dissémination des cellules cancéreuses.

#### III.II.A Implication de septines dans les cancers via leurs partenaires d'interactions

L'oncogène MLL (Mixed Lineage Leukemia) se trouve sur le chromosome 11 et code une histone-lysine N-méthyltransférase qui subit plus de 60 translocations donnant naissance à différentes protéines de fusion impliquées dans plusieurs types de leucémies. Parmi ces translocations se trouvent celles faites avec des chromosomes portant les gènes de la famille des septines : SEPT9 (Osaka et al., 1999 ; Kreuziger et al., 2007) SEPT2 (Cerveira et al., 2006 ; van Binsbergen et al., 2007), SEPT6 (Borkhardt et al., 2001 ; Ono et al., 2002 ; Slater et al., 2002 ; Kadkol et al., 2006), ainsi que SEPT5 et SEPT11 (Cerveira et al., 2011). Ces protéines de

fusion contribuent à la progression de la leucémie en raison de l'expression de certains gènes en lien avec la suractivation de MLL, par un mécanisme certes non encore connu.

HIF-1 $\alpha$  est un facteur de transcription qui, à de faibles niveaux d'oxygène, transloque dans le noyau pour activer la transcription de gènes impliqués dans l'angiogénèse. SEPT9\_i1 se lie à HIF-1 $\alpha$ , favorise son activité en accentuant sa translocation nucléaire et le protège de la dégradation (Amir et al., 2006) (Amir et al., 2009), (Amir et al., 2010). Ainsi, les septines participent à l'entretien des cellules cancéreuses en agissant favorablement sur l'angiogénèse.

Du fait de son interaction avec l'actine, SEPT9\_i4 est impliquée dans la directionnalité de la migration des cellules du cancer du sein MCF7 (Chacko et al., 2005). La modification des fibroblastes en CAF (Cancer Associated Fibroblasts) nécessite la surexpression de la protéine BORG2, une protéine effectrice de Cdc42 et liant les septines à l'actine (Calvo et al., 2015). Cette liaison fortifiée des septines à l'actine favorise le remodelage de la matrice extracellulaire, l'invasion des cellules cancéreuses et la croissance de la tumeur (Calvo et al., 2015).

### II.II.B Implication de certaines septines et de leurs isoformes dans les cancers

Dans des cas de leucémies lymphoïdes aiguës et de lymphomes, l'expression de l'isoforme 2 de SEPT4 (SEPT4\_i2), qui normalement favorise l'apoptose, est diminuée (García-Fernández et al., 2010). La faible expression de SEPT10 induit la résistance des cellules cancéreuses au paclitaxel (Xu et al., 2012). SEPT1 est enrichie dans les lamellipodes des cellules du carcinome de l'épithélium pavimenteux (DJM-1) et son absence inhibe la progression cellulaire de cette lignée cancéreuse (Mizutani et al., 2013).

Des analyses bio-informatiques montrent qu'il existe deux ARNm qui codent pour la même isoforme de SEPT9, l'isoforme 4. La première est nommée SEPT9\_v4 et la deuxième SEPT9\_v4\*, différant principalement au niveau de leur 5'UTR (UnTranslated Region). Au niveau de la région 5'UTR de SEPT9\_v4 se trouve un site IRE (Internal Ribosomal Entry) qui permet la traduction de cet ARNm et qui est absent dans SEPT9\_v4\*. Par contre, c'est uniquement au niveau de la région 5'UTR de SEPT9\_v4\* que se trouvent des sites de fixation du suppresseur de tumeur p53. En cas de dommage à l'ADN, p53, par son interaction avec SEPT9\_v4\*, augmente le niveau d'expression de SEPT9\_i4 (Russell and Hall, 2011).

Le locus humain de SEPT9 a été déterminé comme un lieu d'altérations alléliques dans les cancers du sein et des ovaires (Kalikin et al., 2000 ; Russell et al., 2000). De plus, l'amplification du locus a été observé dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain et murin (Montagna et al., 2003) et durant la progression tumorale (Connolly et al., 2011). La résistance au paclitaxel implique la surexpression de SEPT9\_i4 (Chacko et al., 2005). Elle implique aussi la surexpression de SEPT9\_i1 dans différentes lignées cellulaires (Amir and Mabjeesh, 2007 ; Chacko et al., 2012). La résistance au paclitaxel dans les cellules de cancer du sein MDA-MB 231 implique la surexpression de SEPT2, 8, 11 et 9, et plus particulièrement de l'isoforme 1 de cette dernière (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). La surexpression de SEPT9\_i1 dans plusieurs lignées cellulaires sensibles au paclitaxel suffit à induire une résistance (Targa et al., 2019). Ainsi, la forte expression de SEPT9\_i1 est associée à un mauvais pronostic du carcinome de la tête et du cou (Stanbery et al., 2010) et à un stade avancé de cancer de la prostate (Gilad et al., 2015).

Dans le cancer colorectal, l'expression de SEPT9\_i1 est réduite alors que celle des isoformes 2, 4, et 5 est élevée. La faible expression est due à la méthylation du promoteur de SEPT9, ce qui diminue la transcription (Tóth et al., 2011). D'après ces résultats, une nouvelle technique de diagnostic du cancer colorectal a émergé, basée sur la détection dans le sang d'ADN méthylé de SEPT9 (Ma et al., 2017).

SEPT9 est aussi retrouvée dans les pseudopodes, des protrusions membranaires des cellules cancéreuses qui apparaissent dans les cellules subissant la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT). La déplétion de SEPT9 dans ces cellules inhibe la transition et ainsi la migration et l'invasion (Shankar et al., 2010).

Une étude récente de (Zeng et al., 2019) montre que le mécanisme par lequel SEPT9\_i1 induit la progression tumorale est en augmentant l'activation de la voie de signalisation FAK/Src/Paxilline par l'activation de RhoA/Rock1. Ceci montre que SEPT9 accentue la migration des cellules cancéreuses en modulant les adhérences focales.

## Partie IV : Les BORGs

### I. La découverte de la famille des BORG (Binder of Rho GTPase) / Cdc42EP/ CEP (Cdc42 effector proteins)

Le premier membre de la famille des BORG qui a été découvert est la protéine MSE55 qui est maintenant appelé CEP1/BORG5. Cette découverte fortuite repose sur l'utilisation d'un anticorps contre l'hémonectine, qui a mis en évidence dans des lysats de cellules endothéliales une bande à 65kDa et sur du sérum humain une bande à 55kDa. L'analyse du cDNA de la protéine de 55kDa a permis de faire des séries de Northern Blot montrant que cette dernière était spécifiquement exprimée dans les cellules endothéliales et stromales de la moelle osseuse. De plus, l'expression du cadre ouvert de lecture de cette protéine dans *Escherichia coli* a permis de produire un anticorps polyclonal spécifique. Cet anticorps ne reconnaissant pas l'hémonectine suggérait que la bande de 55kDa correspondait à une nouvelle protéine. Cette dernière, selon ses caractéristiques, a été nommée MSE55 pour Marrow Stromal Endothelial protein de 55kDa (Bahou et al., 1992).

MSE55 s'est avérée être une protéine effectrice de Cdc42 lors d'une recherche de nouveaux effecteurs de Cdc42 et Rac dans la base de données de GenBank® en utilisant le motif CRIB de la protéine murine p65<sup>PAK</sup>. Elle a été caractérisée comme étant une protéine qui n'est pas une kinase mais qui se lie fortement à la forme GTP de Cdc42 via un domaine CRIB intact (Burbelo et al., 1995 ; Burbelo et al., 1999), faiblement à Rac et pas du tout à Rho (Burbelo et al., 1995).

D'autres protéines qui ressemblent à MSE55 ont été découvertes lors de deux études menées en même temps mais en utilisant deux approches différentes : la première a permis de découvrir la famille des BORG (Binder of Rho GTPase) (Joberty et al., 1999) et la deuxième a permis d'identifier la famille des CEP (Cdc42 Effector Proteins) (Hirsch et al., 2001). Il s'est avéré que les membres de ces deux familles étaient identiques. Il en résulte que des nomenclatures différentes se retrouvent dans la littérature pour les mêmes protéines : CEP1/MSE55/BORG5, CEP2/BORG1, CEP3/BORG2, CEP4/BORG4 et CEP5/BORG3. La découverte de la famille des CEPs a été faite en cherchant dans la base de données EST (expressed sequence tag) des séquences similaires à la séquence d'acides aminés de MSE55. Ceci a mené à la découverte de 4 protéines qui possèdent un domaine CRIB et qui sont



régulées par Cdc42 d'où leurs noms de protéines effectrices de Cdc42 (Hirsch et al., 2001). La découverte de la famille des protéines BORG a pour origine un test de double hybride sur une librairie d'embryons de souris âgées de 9 jours en utilisant la Rho GTPase TC10 comme appât. Selon cette étude, puisque les autres membres de la famille des BORG possèdent des masses moléculaires différentes et que leur expression n'est pas restreinte à un type cellulaire particulier, une nomenclature qui met plus en valeur la fonction de ces protéines a été adoptée, d'où le terme BORG (Binder of Rho GTPase).

## II. La structure générale des BORG

### II.1 Le polymorphisme

Après leur découverte grâce au criblage des bases de données humaines et murines, les cinq protéines appartenant à la famille des BORG ont été caractérisées comme étant de taille relativement petite, allant de 15 à 55kDa. Peu d'études ont été menées sur ces protéines, mais la consultation des bases de données GenBank® et Uniprot® a néanmoins permis de collecter les informations suivantes (**Tableau 2**). Les gènes des protéines BORG se trouvent sur des chromosomes différents et donnent naissance à un seul transcrit sauf dans le cas de CEP3/BORG2 où on en retrouve six. Il est également à noter que BORG2 est la seule BORG à avoir un pseudogène (Gene ID : 100128845).

**Tableau 2: Gènes et transcrits codant les protéines BORG humaines**

Gène	Localisation	Pseudogènes	Nombre de transcrits	Nombre d'acides aminés	Masse de la protéine (kDa)	Statut RefSeq NCBI	Référence sur GenBank®	Référence sur Uniprot®
CEP1/Borg5/MSE55	22q13.1	-	1	391	40	En révision	11135	Q00587
CEP2/Borg1	11q13.1	-	1	210	22,5	En révision	10435	O14613
CEP3/Borg2	2p22.2	1	6	254	27,5	En révision	10602	Q9UKI2
CEP4/Borg4	17q25.1	-	1	356	38	En révision	23580	Q9H3Q1
CEP5/Borg3	19q13.42	-	1	148	15,5	En révision	148170	Q6NZY7

Selon GenBank®, ces gènes sont conservés non seulement chez les humains et la souris mais sont aussi retrouvés chez le chimpanzé, le singe rhésus, le chien, la vache, le rat et le poulet. Ils possèdent des orthologues dans plusieurs espèces dont les oiseaux, alligators, lézards, tortues, amphibiens et poissons osseux et cartilagineux. Cependant, il n'existe pas d'orthologues chez les bactéries, levures, insectes ou vers suggérant une émergence tardive

dans l'évolution (Farrugia and Calvo, 2016). Néanmoins, il est à noter que les protéines BORG possèdent deux homologues fonctionnels dans la levure appelés Gic1 et Gic2 (Chen et al., 1997 ; Sadian et al., 2013).

## II.II Les domaines fonctionnels

La partie N-terminale de ces protéines contient un domaine basique conservé dans toute la famille des BORG et dont la taille varie entre 3 acides aminés pour BORG5 et 13 acides aminés concernant BORG1 (Joberty et al., 1999) (**Figure 43 marqué en violet**). Le rôle de ce domaine dans les protéines BORG n'est pas encore connu, bien que des études sur leur homologue fonctionnel dans la levure Gic2 montre que le domaine polybasique sert à lier la protéine au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate à la membrane plasmique (Orlando et al., 2008).

Le domaine CRIB (Cdc42, Rac Interactive Binding) (**Figure 43 marqué en orange**) présente de fortes homologies entre les différentes protéines. Ce domaine permet à toutes les BORG de se lier spécifiquement à Cdc42 et à la Rho-GTPase TC10 quand ils sont sous leur forme GTP (Burbelo et al., 1995 ; Burbelo et al., 1999 ; Hirsch et al., 2001), à l'exception de BORG3 qui est juste capable de lier Cdc42. Une analyse de séquence montre que BORG3 possède 3 acides aminés de moins en amont de son domaine CRIB que les autres membres de la famille, ce qui pourrait influencer sa liaison à TC10 (Joberty et al., 1999).

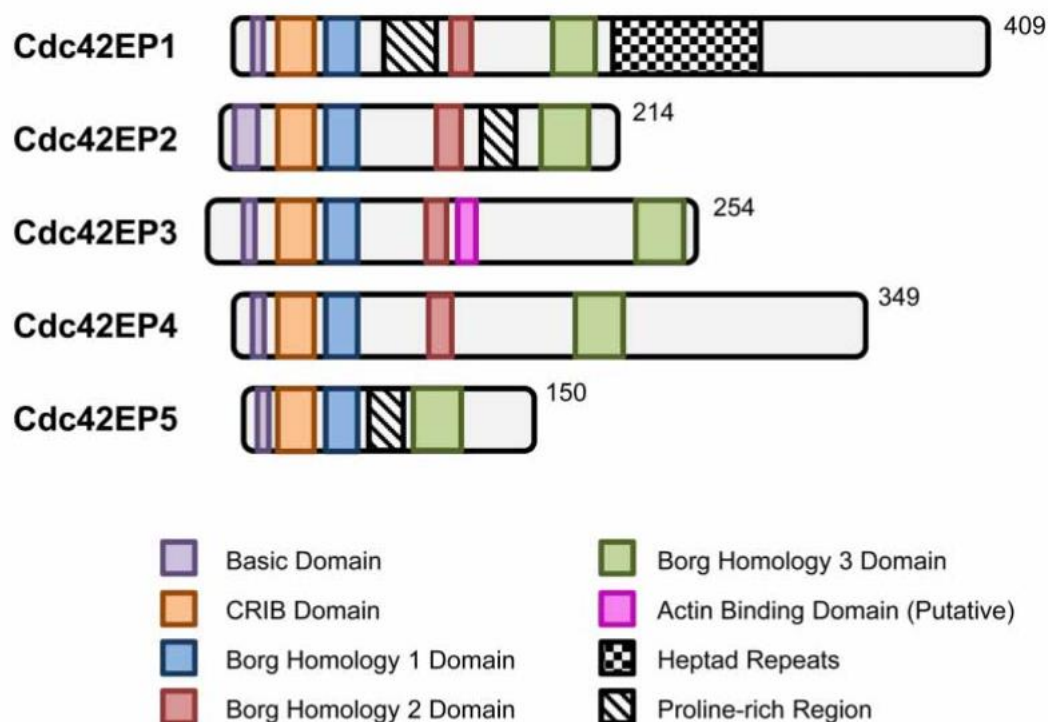
Adjacent au domaine CRIB, se trouve un domaine bien conservé de 12 acides aminés, considéré aussi comme étant une extension du domaine CRIB. Ce domaine est spécifique des protéines BORG et a donc été appelé le « Borg Homology 1 » (BH1) (Joberty et al., 1999 ; Hirsch et al., 2001) (**Figure 43 marqué en bleu**). Ce domaine pourrait influencer la liaison spécifique des BORG à Cdc42 et TC10 et non pas à Rac1 (Burbelo et al., 1995).

La partie centrale et la partie C-terminale des protéines BORG sont les plus variables. Deux autres domaines spécifiques des protéines BORG appelés « Borg Homology 2 » (BH2) (**Figure 43 marqué en rouge**) et « Borg Homology 3 » (BH3) (**Figure 43 marqué en vert**) ont été aussi détectés. Le domaine BH2 est absent de BORG3. Le domaine BH3 a une localisation plutôt centrale dans BORG5 alors qu'il est présent dans la partie C-terminale des autres BORG (Joberty et al., 1999). Le rôle du domaine BH2 n'est pas encore connu mais celui du domaine BH3 a été identifié à la suite d'une étude qui avait pour but de trouver les voies de signalisation

dans lesquelles les BORG étaient impliquées (Joberty et al., 2001). Des expériences d'immunoprécipitation sur des lysats de fibroblastes murins NIH 3T3 ont mis en évidence que BORG1, BORG2 et BORG3 étaient capables de se lier physiquement aux septines via ce domaine. Spécifiquement, le domaine de BH3 de BORG3 se lie à des hétérodimères contenant SEPT6 ou SEPT7 et au trimère SEPT2/6/7 en reconnaissant l'interface entre les domaines coiled-coil dans SEPT6 et SEPT7 (Sheffield et al., 2003).

De plus, BORG1, 3 et 5 possèdent une région riche en proline (**Figure 43, motif rayure**) plutôt au centre de la séquence alors que BORG5 est le seul de la famille à avoir une région heptade (consensus PAANPPA) dans la partie C-ter (Joberty et al., 1999). Le rôle de ces domaines dans le fonctionnement des protéines BORG reste encore à clarifier.

Plus récemment, (Calvo et al., 2015) ont montré que BORG2 était nécessaire pour le remodelage du réseau d'actine dans les CAF (Cancer Associated Fibroblasts) et qu'un site de liaison à l'actine (**Figure 43 marqué en rose**) ressemblant à celui de l'anilline était présent juste après son domaine BH2.



**Figure 43: Schéma représentant les différents domaines des protéines BORG**

(Farrugia and Calvo, 2016)

### III. Localisation tissulaire

Après sa caractérisation en 1992, MSE55 a été retrouvée exprimée uniquement dans les cellules endothéliales et stromales de la moelle osseuse mais pas dans le foie, la rate, le cerveau, les poumons et les reins de singe (Bahou et al., 1992). En 1999, des études sur l'expression tissulaire de BORG1 et BORG2 ont montré que ces gènes sont exprimés dans les huit tissus humains étudiés : Cœur, cerveau, placenta, poumons, foie, muscle squelettique, rein et pancréas. BORG1 et BORG2 présentent un niveau d'expression important dans le cœur. Par contre, l'expression de BORG1 est faible dans le pancréas et le foie et celle de BORG2 très faible au niveau du foie et du cerveau. BORG4 semble ne pas être exprimé dans les tissus adultes (Joberty et al., 1999). En 2014, une étude transcriptomique quantitative a été faite pour tous les gènes humains afin d'identifier leur spécificité d'expression tissulaire, (Fagerberg et al., 2014) incluant les gènes codant pour la famille des BORG. Contrairement aux premiers résultats publiés concernant BORG5/CEP1/MSE55, cette étude met en évidence que l'expression de ce gène est retrouvée, à différentes échelles, dans 26 des 27 tissus étudiés tels que : foie, ovaire, pancréas, cerveau, etc. De façon surprenante, c'est dans la moelle osseuse qu'il serait le moins exprimé. Les autres gènes des protéines BORG sont exprimés dans les 27 tissus étudiés à des niveaux différents. Venant contrecarrer les résultats de l'étude de 1999, il faut notamment noter que l'expression du gène codant BORG4 est détectée dans la totalité des 27 tissus adultes étudiés, dont le cerveau. Dans le cervelet, BORG4 est exclusivement exprimé dans la glie de Bergmann (Ageta-Ishihara et al., 2015).

### IV. La régulation des protéines BORG

#### IV.1 Cdc42

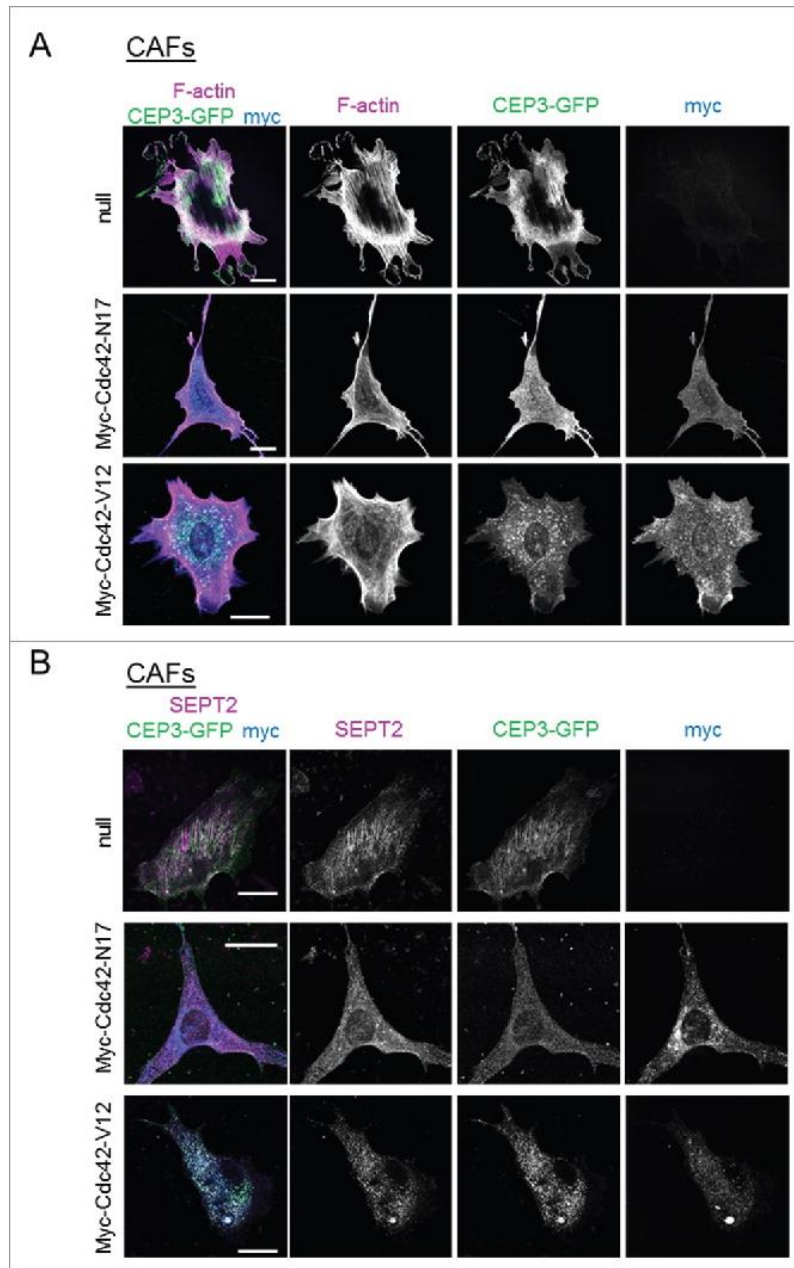
La capacité de Cdc42 à alterner entre la forme active GTP et la forme inactive GDP est importante pour la régulation de l'activité des BORG. Le niveau d'activation de Cdc42 affecte la présence et la localisation des protéines BORG dans la cellule ainsi que leur capacité à interagir avec les septines (Burbelo et al., 1999 ; Hirsch et al., 2001 ; Joberty et al., 2001).

#### IV.I.A Cdc42 constitutivement inactif

L'expression de la forme dominante négative de Cdc42 bloque les réarrangements du cytosquelette induits par la surexpression de BORG : La formation de protrusions membranaires riches en actine induite par la surexpression de MSE55/BORG5 dans les cellules NIH 3T3 est en effet bloquée par l'expression de la forme inactive de Cdc42 (Burbelo et al., 1999). Ce résultat a été retrouvé dans une autre étude, où la formation de pseudopodes consécutive à la surexpression des BORG 1 à 4 dans les cellules NIH 3T3 est également inhibée lorsque la forme inactive de Cdc42 est exprimée (Hirsch et al., 2001). De plus, l'expression du dominant négatif de Cdc42 dans les CAFs (Cancer Associated Fibroblasts) résulte en la perte de BORG2 dans les cellules et induit par conséquent la perte des filaments de septines et des fibres de stress (Farrugia and Calvo, 2017) **(Figure 44 A et B)**.

#### IV.I.B Cdc42 constitutivement actif

Contrairement à ce que l'on pourrait croire, l'activation constante de Cdc42 ne potentialise pas l'effet des BORG dans la cellule. La forme constitutivement active de Cdc42 en se liant sur son domaine CRIB change la conformation de BORG3, cachant ainsi le domaine BH3 de la protéine, et par conséquent inhibant sa liaison aux septines (Joberty et al., 2001). Par ailleurs, lorsque surexprimé dans les CAFs, le Cdc42 constitutivement actif se concentre dans des patches où il attire BORG2, empêchant ce dernier de se lier aux septines et à l'actine (Farrugia and Calvo, 2017) **(Figure 44 A et B)**.



**Figure 44: Effet des formes constitutivement actives et inactives de Cdc42 sur Cdc42EP3/BORG2 (A et B), la F-actine (A) et les septines (B) dans les CAFs exprimant de façon stable Cdc42EP3**

(A) Marquage GFP (vert), F-actine (Magenta) et Myc (Bleu) des CAFs (fibroblastes associés aux cancers) exprimant de façon stable Cdc42EP3 après transfection par un vecteur vide, myc-Cdc42-N-17 ou myc-Cdc42-V12. Barre d'échelle = 25mm. (B) Marquage GFP (vert), SEPT2 (Magenta) et Myc (Bleu) des CAFs (fibroblastes associés aux cancers) exprimant de façon stable Cdc42EP3 après transfection par un vecteur vide, myc-Cdc42-N-17 ou myc-Cdc42-V12. Barre d'échelle = 25mm

(Farrugia and Calvo, 2017)

## IV.II TC10/RhoQ et RhoA

TC10, aussi nommée RhoQ, est une GTPase considérée comme homologue proche de Cdc42. Il a été démontré que toutes les BORG sauf BORG3 lient via leur domaine CRIB la forme active de TC10 (Joberty et al., 1999), mais cette régulation n'est pas bien caractérisée.

## IV.III PKC

L'interaction entre aPKC (atypical Protéine Kinase C) et BORG5 se fait dans un contexte de différenciation de cellules souches embryonnaires de souris en trophoctoderme et a été mise en évidence par des expériences d'immunoprécipitation. La différenciation des cellules souches est régulée par des modifications traductionnelles. Le passage vers le trophoctoderme nécessite une surexpression de BORG5 et de Cdx2, un facteur de transcription impliqué dans cette différenciation. Une diminution d'expression de BORG5 mène à une diminution d'expression de Cdx2, et vice versa. Cette boucle de régulation n'est pas due à une interaction entre les deux protéines, mais a plutôt pour origine une interaction entre BORG5 et aPKC fonctionnant en amont de Cdx2 et induisant la diminution de son expression (Vong et al., 2010).

Dans les cellules de cancer du sein MCF-10A, PKC phosphoryle BORG4 au niveau de la sérine en position 18 ou 80. La phosphorylation de BORG4 le détache de Cdc42 et lui permet d'interagir avec TEM4 (Tumor Endothelial Marker-4). Ce dernier étant un Rac-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), Rac va être activé et induire par voie de conséquence la formation de filopodes et augmenter la motilité cellulaire (Zhao and Rotenberg, 2014).

## IV.IV Les MAP kinases ERK2, ERK3 et MK5

La kinase ERK3 (Extracellular signal Regulated Kinase 3) et son substrat, la MAPK-activated protein (MAPKAP) kinase 5 (MK5), forment un complexe ternaire avec SEPT7 et phosphorylent BORG1, 2 et 3. La formation de ce complexe joue un rôle important dans la régulation du cytosquelette neuronal et la formation de l'arbre dendritique (Brand et al., 2012). Par ailleurs, BORG5 et BORG1 ont été identifiés comme étant des substrats de ERK2. La technique utilisée que les auteurs appellent chimique-génétique consiste en l'élargissement de la poche de

liaison à l'ATP de ERK2 afin que cette dernière se lie à un analogue de l'ATP marqué permettant d'identifier et d'isoler les substrats (Carlson et al., 2011).

#### IV.V HGF, TGF $\beta$ et SDF-1 $\alpha$

La transformation des fibroblastes normaux en CAFs est caractérisée par une augmentation d'activation de la Myosine Light Chain 2 (MLC2) et de la Src kinase. Cette activation est induite par une augmentation d'expression de BORG2 dans les fibroblastes, résultant d'une augmentation de la production d'ARNm de cette protéine effectrice de Cdc42 induite par HGF, TGF $\beta$  et SDF-1 $\alpha$  (Calvo et al., 2015).

#### IV.VI PUMILIO2

PUMILIO2 est une protéine qui régule la transcription de différents ARNm dans les cellules souches germinales. L'expression de BORG2 au niveau du tissu testiculaire est régulée par PUMILIO2 en se fixant sur un motif particulier dans la région 3'UTR (Spik et al., 2006).

### V. L'intéactome des protéines BORG

#### V.I RhoA

Bien qu'aucune interaction du domaine CRIB des BORG avec RhoA n'ait été détectée, un lien entre BORG3 et RhoA existe néanmoins. En effet, la surexpression de BORG3 dans les cellules NIH 3T3 induit la formation de filopodes. Ce phénotype ne peut pas être reproduit par la surexpression de la forme constitutivement active de Cdc42 mais a déjà été observé en inhibant RhoA. De façon intéressante, l'expression de RhoA dans des cellules formant des filopodes inhibe ce phénotype. Ces résultats indiquent que BORG3 agit en amont de RhoA et l'inhibe (Joberty et al., 1999).

#### V.II JNK

La kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) est activée par Cdc42 à la suite de l'activation de voies de signalisation par différents stress. La coexpression de BORG3 et de JNK dans les cellules NIH 3T3 inhibe l'activité basale de JNK dans les cellules, et ceci de façon indépendante de



Cdc42 puisque l'expression de BORG3 mutée au niveau de son domaine CRIB induit le même effet (Joberty et al., 1999).

### V.III Septines

Les protéines BORG influencent l'assemblage et le rôle des filaments de septines. Dans les cellules NIH 3T3, la surexpression de BORG3 couplée à un tag Myc induit la formation de longues et épaisses fibres de septines (Joberty et al., 2001). Dans les CAFs, une délétion de BORG2 mène à une perte des filaments de septines et consécutivement à une perte des fibres de stress (Calvo et al., 2015). De plus, une délétion de BORG3 affecte la formation de filaments incluant SEPT9 dans les cellules de mélanome (Farrugia et al., 2020). Dans la glie de Bergmann, l'interaction de BORG4 avec les hétéro-oligomères de septines est nécessaire pour la localisation perisynaptique des transporteurs de glutamate (Ageta-Ishihara et al., 2015).

### V.IV Actine

Les protéines BORG peuvent être cytoplasmiques ou localisées à la membrane plasmique (Joberty et al., 1999 ; Hirsch et al., 2001), mais sont aussi retrouvées au niveau des fibres de stress d'actine, comme dans les cas de BORG3 en raison de sa liaison aux septines (Farrugia et al., 2020) et de BORG2, qui lui possède un site de liaison à l'actine (Calvo et al., 2015 ; Farrugia and Calvo, 2017). Quelles que soient leurs localisations, les protéines BORG sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine (**Tableau 3**).

**Tableau 3: Implication des protéines BORG dans le remodelage du cytosquelette d'actine**

Protéine	Rôle dans la cellule	Référence
<b>BORG1</b>	Réduction de l'abondance des fibres de stress	(Joberty et al., 1999)
	Formation de pseudopodes	(Hirsch et al., 2001), (Wu et al., 2015)
<b>BORG2</b>	Formation de lamellipodes	(Joberty et al., 1999)
	Formation de pseudopodes	(Hirsch et al., 2001)
	Formation des fibres de stress et augmentation de la contractilité cellulaire	(Calvo et al., 2015) (Farrugia and Calvo, 2017)
<b>BORG3</b>	Formation de lamellipodes	(Joberty et al., 1999)
	Augmentation de la contractilité de l'actomyosine	(Farrugia et al., 2020)
<b>BORG4</b>	Formation de pseudopodes	(Hirsch et al., 2001)
	Formation de filopodes	(Zhao and Rotenberg, 2014)
<b>BORG5</b>	Formation de protrusions membranaires riches en actine	(Burbelo et al., 1999) (Vong et al., 2010)

## VI. Implication en physiologie et en physiopathologie

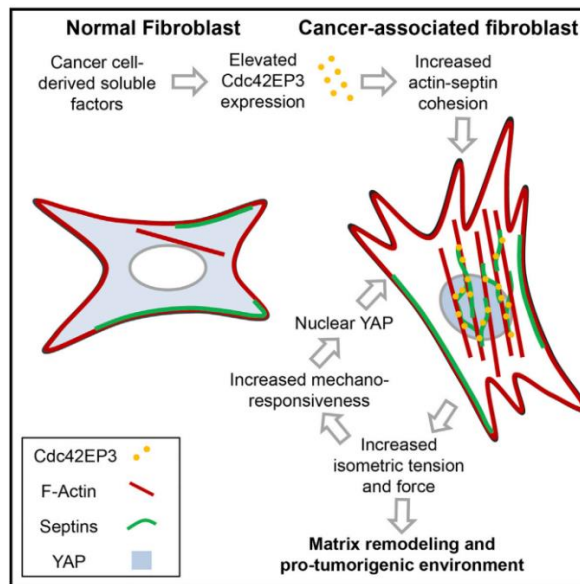
### VI.I Différenciation du trophoctoderme et du myoblaste

Inhibée dans les cellules souches embryonnaires de souris, la transcription de BORG5 est augmentée durant leur différenciation en cellules du trophoctoderme. En effet, une inhibition d'expression de BORG5 inhibe la motilité nécessaire pour que les cellules souches embryonnaires adoptent un destin de trophoctoderme. Ces résultats montrent l'importance de l'expression de BORG5 dans cette différenciation, qui permet de réguler la motilité cellulaire via son action sur la formation de protrusions d'actine (Vong et al., 2010). Aussi, l'expression de BORG1 augmente au cours de la différenciation des myoblastes C2C12 pour diminuer graduellement en fin de différenciation (Wu et al., 2015).

### VI.II Migration des cellules cancéreuses et métastases

BORG3 est impliquée dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome *in vivo*. En effet, en se liant à SEPT9 qui est associée à la F-actine, BORG3 induit la polymérisation de l'actine et renforce la formation et la stabilisation induite par SEPT9 de faisceaux de filaments d'actine. Cette association BORG3/SEPT9 entraîne la réorganisation de l'actine en fibres de stress et actine corticale, augmentant ainsi la contractilité de l'actomyosine. BORG3 est également retrouvée sur les filaments de F-actine en contact avec les adhérences focales (AF) et est important pour la maturation de ces AFs, augmentant ainsi la motilité des mélanomes (Farrugia et al., 2020).

L'augmentation de l'expression de BORG2 induite par des facteurs solubles sécrétés par les cellules cancéreuses est un élément clé pour la transformation de fibroblastes normaux en CAFs (Cancer Associated Fibroblasts). Cette surexpression, en présence d'un Cdc42 capable d'alterner entre la forme GTP et GDP (Farrugia and Calvo, 2017), affecte le réseau de septines et par conséquent le réseau d'actine, ce qui augmente la contractilité de l'actomyosine. Ceci donne aux CAFs leur capacité de remodeler la matrice de la tumeur, et de promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses (Calvo et al., 2015) (**Figure 45**).



**Figure 45: Effet de la surexpression de Cdc42EP3/BORG2 sur l'organisation des septines et de l'actine dans les CAFs**

(Calvo et al., 2015)

De plus, une étude menée pour déterminer les gènes responsables du phénotype invasif des cellules de carcinome hépatocellulaire démontre que BORG2 est impliquée dans la migration de ces cellules (Lin and Chuang, 2012).

### VI.III Angiogenèse

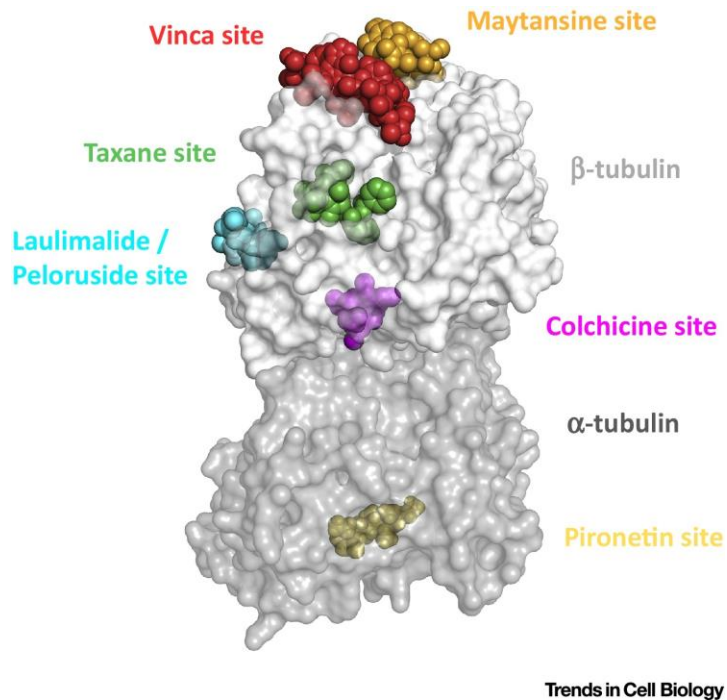
Un rôle de BORG5 dans l'angiogenèse microvasculaire a été mis en évidence chez des souris. Des souris KO pour BORG5 montrent en effet des défauts dans la microvascularisation rétinienne et cardiaque. BORG5 associée aux septines et colocalisant avec les fibres d'actomyosine dans la région périnucléaire, promeut l'angiogenèse en contrôlant spatialement l'activité de l'actomyosine pour assurer une directionnalité de migration des cellules endothéliales (Liu et al., 2014).

## Partie V : La chimiothérapie par les anticancéreux ciblant les microtubules

Chaque année, la 'American Cancer Society' prédit le nombre de nouveaux cas de cancers ainsi que le nombre de nouveaux décès par cancer. En 2020, elle estime que 1,8 millions de nouveaux cas et 606 520 nouveaux décès seront comptabilisés aux États-Unis, uniquement (Siegel et al., 2020). En France, en 2017, le nombre de nouveaux cas de cancers estimé était de 399 500 et le nombre de décès de 150 000 (Cowppli-Bony et al., 2019). Malgré tout, les traitements contre le cancer sont efficaces car, de 1991 à 2017, la mortalité par cancer a diminué de 29%. Cependant, durant la dernière décennie, la diminution de la mortalité a ralenti d'où la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, des indicateurs précoces ainsi que des indicateurs de mauvais pronostic ou de réponse aux traitements afin de cibler au mieux la tumeur chez un patient (Siegel et al., 2020). Les traitements peuvent combiner la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et depuis peu, l'immunothérapie.

Le développement des agents utilisés en chimiothérapie a commencé en 1940 avec les moutardes azotées qui ciblent les bases de l'ADN. Juste après, ont été développés les antimétabolites, qui n'attaquent pas directement l'ADN pour induire la mort cellulaire mais miment ou ciblent des précurseurs d'ADN pour causer des erreurs dans la réplication. Les agents pharmacologiques qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse sont les antimétabolites qui ciblent les MTs.

Les agents ciblant les MTs ont été classés en deux groupes : les stabilisateurs et les déstabilisateurs de MTs. Cependant, leur effet sur la dynamique des MTs dépend de leurs concentrations. Les anticancéreux, déstabilisateurs à de fortes concentrations, stabilisent les MTs à de faibles concentrations sans modifier la masse du polymère (Vasquez et al., 1997 ; Pourroy et al., 2006 ; Braguer et al., 2008). Ainsi, les anticancéreux ciblant les MTs seront présentés selon leur site de liaison à la tubuline.



**Figure 46: Site de liaison des différents agents ciblant les microtubules**

(Steinmetz and Prota, 2018)

### I. Le site de liaison aux vinca-alcaloïdes

Les membres de la famille des vinca-alcaloïdes tels que vinblastine, vincristine et vinorelbine se lient aux dimères de tubuline libres à un site localisé près du site de liaison échangeable du GTP de la  $\beta$ -tubuline (Gigant et al., 2005) (**Figure 46 marqué en rouge**). Ce site n'est exposé qu'au niveau des extrémités plus des MTs. Les vinca-alcaloïdes sont des agents déstabilisateurs à forte dose (du même ordre de grandeur que la concentration cellulaire en tubuline, soit de 5 à 10  $\mu\text{M}$ ) car en se liant à la tubuline libre, ils inhibent l'assemblage de la tubuline. Ce sont donc des agents anti-polymérisants. Comme ces molécules n'inhibent pas la dépolymérisation des MTs, cette dernière se poursuit et libère des sous-unités de tubuline qui lient aussitôt les vinca-alcaloïdes. Ces phénomènes induisent rapidement la dépolymérisation des MTs pré-existants. A des concentrations plus faibles, si elles ne séquestrent qu'une très faible fraction de la tubuline libre et ne peuvent plus inhiber son assemblage, ces molécules sont néanmoins capables de lier l'extrémité plus des MTs et de perturber fortement leur dynamique. On estime que la liaison de quelques molécules de vinblastine par MT suffit à inhiber complètement le comportement dynamique des MTs, c'est-à-dire l'instabilité

dynamique et le treadmilling (Jordan and Wilson, 2004). C'est ainsi que ces agents antipolymérisants bloquent la progression mitotique et induisent la mort cellulaire par apoptose. Ils sont utilisés en traitement de tumeurs solides ou hématologiques malignes, seuls ou en combinaison avec d'autres agents cytotoxiques.

## II. Le site de liaison à la maytansine

La maytansine est un composé isolé de la plante *Maytenus ovatus* (Kupchan et al., 1972) qui se lie à la  $\beta$ -tubuline de l'hétérodimère à un site proche de celui des vinca-alcaloïdes (Remillard et al., 1975) (**Figure 46 marqué en orange**). Il inhibe la polymérisation des MTs en empêchant l'interaction entre les dimères de tubuline et donc leur incorporation aux bouts plus menant ainsi à un arrêt mitotique (Revue : (Steinmetz and Prota, 2018)). Ce composé n'est pas utilisé cliniquement à cause de sa grande cytotoxicité et faible spécificité envers les cellules cancéreuses mais est actuellement étudié en chimiothérapie couplée à un conjugué d'anticorps augmentant sa spécificité dans le ciblage des cellules cancéreuses (Lopus et al., 2010).

## III. Le site de liaison à la colchicine

La colchicine est une molécule qui se lie avec une grande affinité à la  $\beta$ -tubuline à un site proche de l' $\alpha$ -tubuline, au sein d'un dimère (**Figure 46 marqué en rose**). Ceci résulte en un changement conformationnel du dimère empêchant sa polymérisation (Ravelli et al., 2004). Cette molécule n'ayant eu qu'un faible effet thérapeutique contre le cancer, d'autres agents se liant au site de liaison de la colchicine ont été recherchés et développés. Parmi les molécules appartenant à cette famille se trouve le nocodazole, un produit naturel à activité antimitotique et antitumorale. Ce dernier affecte la survie cellulaire en interférant avec la polymérisation des MTs. Cependant, à cause des effets secondaires qu'il induit, il n'est pas cliniquement utilisé (Attia, 2013). Un autre membre de la famille est le TN-16, un dérivé de l'acide ténazonique, qui possède des effets antitumoraux *in vitro* et *in vivo* en inhibant l'assemblage des MTs (Triodi et al., 2012). Les agents pharmacologiques se liant au site de la colchicine présentent des effets très superposables à ceux des vinca-alcaloïdes : anti-polymérisants à forte dose, stabilisateurs à faible dose. On estime que leurs effets à faible dose résultent de l'incorporation de quelques rares dimères de tubuline liant la drogue par MT (Jordan and Wilson, 2004).

#### IV. Le site de liaison aux Laulimalide et Peloruside A

Ces deux molécules proviennent d'une éponge marine (Mooberry et al., 1999) et inhibent la croissance des cellules cancéreuses en stabilisant les MTs (Pryor et al., 2002). Ces molécules se lient à la  $\beta$ -tubuline à un site unique formé de résidus hydrophobes et, par leur structure, interagissent avec un autre dimère de tubuline dans le filament, renforçant ainsi la stabilité du MT (Prota et al., 2014) (**Figure 46 marqué en bleu**). Les composés laulimalide et peloruside A agissent en synergie avec le paclitaxel et les épothilones dans la promotion de la stabilité des MTs et l'induction de la mort cellulaire (Hamel et al., 2006 ; Wilmes et al., 2007).

#### V. Le site de liaison au Pironetine

La pironetine est un composé isolé des bactéries *Streptomyces* (Kobayashi et al., 1994) a activité antitumorale et antiméiotique en inhibant la formation des MTs (Kondoh et al., 1999). Il se lie à l' $\alpha$ -tubuline (**Figure 46 marqué en jaune**) et déstabilise les MTs en causant des changements conformationnels des dimères, les empêchant de s'incorporer dans les filaments (Yang et al., 2016 ; Prota et al., 2016).

#### VI. Le site de liaison aux Epothilones et aux Taxanes

Les épothilones constituent une famille de polycétides macrolides produits naturellement par la bactérie *Sorangium cellulosum* (Gerth et al., 1996). Il existe six épothilones majeurs (A-F) identifiés et caractérisés (Hardt et al., 2001). Ces agents stabilisent les MTs, menant à leur regroupement en faisceaux, à la formation de fuseaux multipolaires et à l'arrêt de la mitose dans les cellules en division (Bollag et al., 1995). L'analogue de l'épothilone B, l'ixabepilone, a été approuvé par la FDA (U.S Food and Drug Administration) en 2007 pour le traitement du cancer métastatique et le cancer du sein avancé. Le site de liaison des épothilones et celui des taxanes se superposent partiellement sur la  $\beta$ -tubuline dans la lumière du MT (Kamath and Jordan, 2003) (**Figure 46 marqué en vert**).

La famille des taxanes comprend le paclitaxel (Taxol®) et son analogue semi-synthétique le plus connu, le docétaxel (Taxotère®). Ce sont également des stabilisateurs de MTs à faible comme à forte dose. À cause de leurs effets secondaires et de leurs profils pharmacocinétiques, des études ont été faites pour générer des taxanes de deuxième



génération. Ainsi, le nab-paclitaxel correspond à du paclitaxel qui a été modifié avec de l'albumine de sérum humain, ce qui facilite son entrée dans la cellule (Desai et al., 2006). Le cabazitaxel est un dérivé synthétique du docétaxel conçu pour avoir de meilleures propriétés pharmacocinétiques. Les améliorations dans la formule l'ont rendu faiblement reconnaissable par la P-glycoprotéine et lui ont permis d'acquérir un pouvoir de diffusion encéphalique (Tkaczuk and Yared, 2012). La toxicité est principalement hématologique, et il a eu l'autorisation de la mise sur le marché en deuxième ligne (Lheureux and Joly, 2012) utilisé dans des cas de cancers résistants au docétaxel (Vrignaud et al., 2013).

## VI.I Les deux premiers taxanes identifiés : le paclitaxel et le docétaxel

Le paclitaxel (commercialisé sous le nom de Taxol®) (**Figure 47**) appartient à la famille des taxanes caractérisée par la capacité de stabiliser les MTs. C'est un composé diterpénoïde tricyclique produit naturellement dans l'écorce de l'if américain *Taxus brevifolia*. La découverte de cette drogue a été le résultat collaboratif du NCI (National Cancer Institute) et de l'USDA (US Department of Agriculture) utilisant le programme de dépistage des plantes à la recherche de nouveaux agents anticancéreux efficaces (Walsh and Goodman, 2002). Après plusieurs séries d'essais cliniques, la FDA a approuvé le paclitaxel pour le traitement du cancer des ovaires avancé en 1992 (Menzin et al., 1994). Depuis, le paclitaxel est utilisé (en monothérapie ou en association avec d'autres médicaments tels que le cisplatine ou le carboplatine pour le traitement du cancer de l'ovaire (Ozols et al., 2003), du cancer du sein (Piccart and Cardoso, 2003) mais aussi du carcinome épidermoïde de la vessie et des cancers de la tête et du cou (Zhu and Chen, 2019). À cause de sa faible quantité dans l'écorce du conifère, et donc afin de ne pas décimer cette espèce pour soigner les femmes atteintes du cancer du sein, plusieurs autres moyens d'obtention du paclitaxel ont été recherchés, tels que la culture *in vitro* de la plante ou encore l'extraction du paclitaxel de champignons endophytes génétiquement modifiés (Revue : (Zhu and Chen, 2019)). Mais c'est une équipe de chimistes français qui a permis de calmer les différends entre les défenseurs de l'arbre et les femmes en attente d'un traitement efficace. En effet, ils ont mis au point l'hémisynthèse chimique du docétaxel (Taxotère®), une molécule proche et même plus efficace que le paclitaxel, à partir du précurseur 10-deacetylbaaccatin III, dérivé d'une partie renouvelable, les aiguilles, de l'if européen *Taxus baccata* (Rowinsky and Calvo, 2006). L'hémisynthèse de ce taxane a été réalisée pour la première fois au milieu des années 1980 par l'équipe de Pierre Potier à



### VI.II.B Effet du paclitaxel sur des voies de signalisation

Le paclitaxel affecte la survie cellulaire en agissant sur différentes voies de signalisation. Il initie l'apoptose en activant les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), ERK (Bacus et al., 2001 ; Xu et al., 2009), p38 (Bacus et al., 2001 ; Ren et al., 2018) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Kampan et al., 2015). En effet, via son effet sur p38, le paclitaxel induit la déphosphorylation et l'activation de Bax (protéine pro-apoptotique) et la phosphorylation et donc l'inhibition de Bcl2 (protéine anti-apoptotique) (Ren et al., 2018). De manière intéressante, le paclitaxel peut se lier à Bcl2 et entraîner son inactivation (Rodi et al., 1999 ; Ferlini et al., 2009), participant ainsi à l'induction de l'apoptose. La voie de NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) est également activée pour induire l'apoptose (Kampan et al., 2015). De plus, le paclitaxel induit la génération de ROS (Reactive Oxygen Species) et la production d'hydroperoxydes en augmentant l'activité de la NADPH oxydase, conduisant à un stress oxydatif qui potentialise l'effet anticancer du paclitaxel (Alexandre et al., 2007). L'effet du paclitaxel sur l'activité des Rho GTPases Cdc42 et Rac1 a aussi été détecté. Dans les cholangiocarcinomes, un traitement avec une faible dose de paclitaxel pendant 24h diminue l'activation de Cdc42 mais pas de Rac1 (Cadamuro et al., 2016).

La migration, la prolifération cellulaire ainsi que le changement morphologique des cellules endothéliales sont des éléments clés dans l'angiogenèse tumorale. Par son action anti-angiogénique, le paclitaxel et ses dérivés inhibent la progression tumorale, induisant la mort des cellules cancéreuses par nécrose (Klauber et al., 1997). L'effet du paclitaxel, de ses dérivés ainsi que des autres membres de la famille des taxanes sur les cellules endothéliales a été évalué dans différentes études : La migration et l'invasion des cellules endothéliales ainsi que leur changement conformationnel a été affecté suite à une exposition à court terme au docétaxel ou à l'épothilone B, à des concentrations n'affectant pas la prolifération cellulaire. Ces derniers agissent sur la dynamique des MTs en interphase des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), réduisant l'activation de Cdc42 et de Rac1 et affectant ainsi le cytosquelette d'actine (Bijman et al., 2006). Ces Rho GTPases induisent la polarisation correcte des cellules et régulent l'orientation du centrosome des cellules en migration (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Le paclitaxel, qui inhibe la migration (Wang et al., 2019) affecte ce phénomène par son effet sur Cdc42 et Rac1. Il a également été décrit qu'un traitement par du docétaxel, en induisant la dégradation de la chaperone Hsp90, empêche la

phosphorylation de la kinase des adhérences focales (Akt), une de ses protéines clientes, et inhibe la migration des cellules HUVEC (Murtagh et al., 2006).

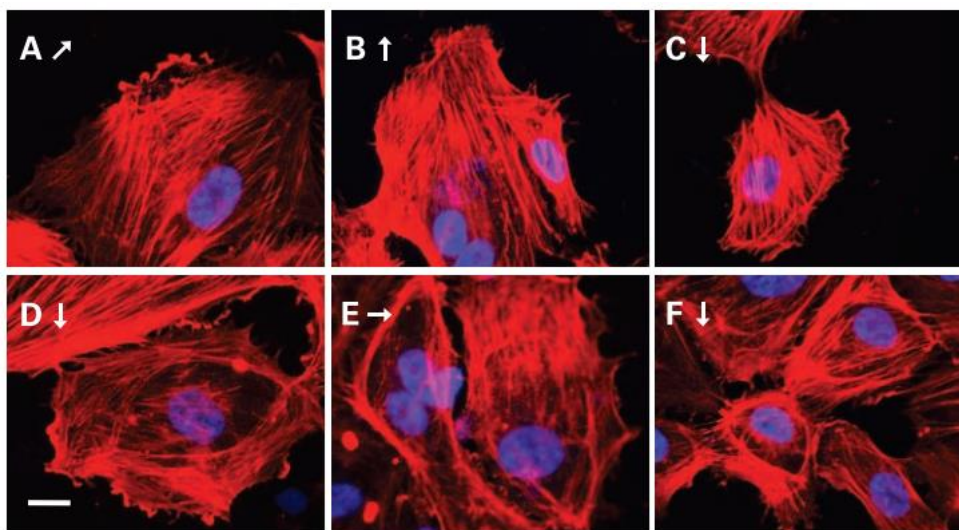
#### VI.II.C Effet du paclitaxel sur l'expression et la localisation de certaines protéines

Le paclitaxel agit non seulement sur l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation, mais aussi sur l'expression de certaines protéines. En effet, cette molécule possède une activité inhibitrice de l'angiogenèse en inhibant l'expression de VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Lau et al., 1999) mais aussi en causant l'ubiquitination et donc la dégradation de Hsp90 (Heat shock protein 90) (Murtagh et al., 2006). La neuropathie est un effet secondaire du paclitaxel, qui a pour origine la diminution du niveau protéique de NCS-1 (Neuronal Calcium Sensor 1), affectant ainsi la signalisation du calcium (Boehmerle et al., 2007). Il agit aussi sur la localisation de certaines protéines, comme l'oncoprotéine GT198 qui est une nouvelle cible du paclitaxel récemment découverte. C'est une protéine qui se lie à l'ADN afin de stimuler sa réparation, qui régule la méiose et participe à la recombinaison d'ADN homologue. Le paclitaxel se lie à GT198 au niveau de son site de liaison à l'ADN, inhibant ainsi son effet transcriptionnel (Yang et al., 2019). L'expression nucléaire dans le cholangiocarcinome de S100A4, une protéine de liaison au calcium, est un signe d'agressivité du cancer puisqu'elle participe à l'invasion. Le paclitaxel, en inhibant la SUMOylation de cette protéine, empêche son passage vers le noyau, limitant ainsi son effet agressif (Cadamuro et al., 2016). L'inhibition du passage vers le noyau a également été observée pour HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor 1), protéine surexprimée dans les centres hypoxiques des tumeurs. Le transport de son ARNm vers le noyau est dépendant de la dynéine, et est perturbé à cause de l'effet stabilisateur du paclitaxel (Carbonaro et al., 2011). Il en est de même pour le récepteur AR (Androgen Receptor) dont la translocation est nécessaire pour la progression du cancer de la prostate (Darshan et al., 2011). Cependant, de faibles concentrations de paclitaxel accentuent le transport dynéine-dépendant vers le bout moins des MTs du facteur de transcription p53 induisant ainsi l'apoptose (Giannakakou et al., 2002).

#### VI.II.D Effet du paclitaxel sur les autres membres du cytosquelette

Le paclitaxel est connu pour affecter majoritairement la dynamique des MTs, ce qui perturbe alors l'organisation des autres membres du cytosquelette. En effet, l'exposition des cellules granulosa au paclitaxel engendre la formation de faisceaux de MTs qui par voie de

conséquence affecte les filaments intermédiaires et les fibres de stress. En présence du paclitaxel, les filaments intermédiaires ne sont plus dispersés dans le cytoplasme mais forment des agrégats périnucléaires et les filaments d'actine ne forment plus des fibres de stress mais ont une distribution marginale (Herman et al., 1983). Un traitement des fibroblastes par du paclitaxel induit la décentralisation des MTs, qui deviennent libres dans le cytoplasme et engendre la formation d'actine circulaire (Pletjushkina et al., 1994). Une étude plus récente montre l'effet du docétaxel et de l'épothilone B sur les microfilaments d'actine. Les cellules HUVEC traitées par ces stabilisateurs de MTs, qui réduisent l'activité de Cdc42 et de Rac1, possèdent moins de fibres de stress (Bijman et al., 2006) **(Figure 48)**.



**Figure 48: Effet de différents agents anti-cancéreux sur le cytosquelette d'actine dans les cellules HUVEC**

*Images acquises par microscopie à fluorescence avec le noyau marqué en bleu et la F-actine en rouge.*

*(A) Les HUVEC non-traitées (B) Traitement d'1h avec 10 $\mu$ mol/mL de cisplatine (C) Traitement d'1h avec 100 nmol/mL de doxorubicine (D) Traitement d'1h avec 10 nmol/mL de docétaxel (E) Traitement d'1h avec 1 nmol/mL d'épothilone B (F) Traitement d'1h avec 10 nmol/mL de vinblastine. Les flèches indiquent la direction du mouvement des cellules.*

(Bijman et al., 2006)

L'effet sur les fibres de stress est également observé dans les expériences faites par notre laboratoire, où un traitement par du paclitaxel ainsi qu'un traitement par l'épothilone B sur différentes lignées cellulaires cancéreuses ou immortalisées induit la perte des fibres de stress (Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Targa et al., 2019). Il a également été récemment montré que le paclitaxel induisait des changements conformationnels de l'actine, ainsi qu'une

augmentation des protéines kératines des filaments intermédiaires avec un changement d'interaction entre eux (Chavez et al., 2019).

Un quatrième élément du cytosquelette à être affecté par un traitement par le paclitaxel correspond aux septines. En présence de paclitaxel, les septines présentes en condition basale sur les microfilaments d'actine, relocalisent vers les MTs (Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Targa et al., 2019). Cette relocalisation participe à un mécanisme de résistance détaillé brièvement plus bas, et analysé de façon plus approfondie dans cette thèse.

### [VI.III Les mécanismes de résistance au paclitaxel](#)

Malgré son utilisation sur de nombreux cancers solides, la résistance au paclitaxel représente un obstacle majeur à l'amélioration de la réponse globale et la survie des patients cancéreux. Une résistance au paclitaxel est définie comme la progression de la maladie durant le traitement ou la réapparition du cancer après le traitement. C'est un processus multifactoriel dont la compréhension permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer la réponse aux traitements anti-cancéreux.

#### [VI.III.A Efflux du paclitaxel en dehors la cellule](#)

La surexpression de la pompe d'efflux P-glycoprotéine (P-gp) est responsable de l'éjection des vinca-alcaloïdes et des taxanes en dehors de la cellule (Fojo and Menefee, 2005). Les pompes d'efflux MRP2 et MRP7 sont aussi liées à l'éjection du paclitaxel (Hopper-Borge et al., 2004 ; Huisman et al., 2005). Cette diminution de la concentration intracellulaire de la drogue limitant son efficacité, l'usage de drogues inhibitrices de pompes d'efflux est exploré avec des molécules telles que la coumarine (Tripathi and Misra, 2016), ou des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) qui rentrent en compétition avec le paclitaxel pour la fixation à la pompe à efflux (Bender et al., 2017). De nouvelles façons d'administrer la drogue ont aussi été développées afin d'échapper à ce système d'efflux, telle que l'administration de la drogue par des nanoparticules endocytées par la cellule (Li et al., 2016).

#### [VI.III.B Changements au niveau des MTs](#)

Les niveaux d'expression des isotypes de tubuline dans les cellules cancéreuses sont différents de ceux des cellules d'un tissu sain. En effet, un niveau d'expression important de  $\beta$ III-tubuline est impliqué dans la résistance tumorale aux taxanes. Ceci est observé au niveau du poumon

(Levallet et al., 2012 ; Person et al., 2017), des seins (Hasegawa et al., 2003 ; Lebok et al., 2016) et des ovaires (Izutsu et al., 2008 ; Martinelli et al., 2018). De plus, la surexpression des  $\beta$ I-tubuline et  $\beta$ IVa-tubuline a été respectivement corrélée avec la résistance aux taxanes dans les cancers du sein et des ovaires (Kavallaris et al., 1997 ; Hasegawa et al., 2003). Contrairement à  $\beta$ I,  $\beta$ III et  $\beta$ IVa, l'isotype  $\beta$ II est sous-exprimé dans certaines tumeurs, indiquant une inefficacité des traitements par du paclitaxel (Ohishi et al., 2007). La résistance aux traitements est due aux différences de propriétés dynamiques des isotypes de  $\beta$ -tubuline. Des études *in vitro* montrent que la  $\beta$ III-tubuline est la plus dynamique parmi les différents isotypes (Panda et al., 1994). Les MTs enrichis en  $\beta$ III-tubuline sont caractérisés par des fréquences de catastrophes (dépolymérisation) plus importantes (Pamula et al., 2016), ce qui pourrait contrecarrer l'effet stabilisateur des taxanes. Des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que les cellules mammaires de cancer du sein MDA-MB 231, adaptées à long terme au paclitaxel, engendrent également une surexpression des isotypes  $\beta$ III et  $\beta$ IV de tubuline (Froidevaux-Klipfel et al., 2011).

Dans différentes lignées cellulaires résistantes au paclitaxel, des mutations de  $\beta$ -tubuline ont aussi été détectées, altérant la dynamique des MTs et pouvant contrecarrer l'effet stabilisateur du paclitaxel (Gonzalez-Garay et al., 1999 ; Orr et al., 2003). Des modifications post-traductionnelles au niveau de la partie C-terminale des tubulines affectent leur interaction avec de nombreuses MAPs impliquées dans la régulation de la dynamique microtubulaire. Ces modifications sont induites par la stabilisation, et donc la plus grande durée de vie des MTs sous paclitaxel. Par exemple, l'isotype  $\beta$ III est plus polyglutamylé après un traitement par du paclitaxel dans le cas du carcinome embryonnaire P19 (Laferrière and Brown, 1996). La comparaison des cellules A549 de carcinome pulmonaire humain sensibles et résistantes au paclitaxel met en évidence une variation du recrutement des MAPs sur les MTs. En effet, les cellules résistantes montrent une augmentation du niveau protéique de stathmine favorisant les catastrophes et une inactivation de la MAP stabilisatrice MAP4 (Orr et al., 2003). Une augmentation de certaines modifications post-traductionnelles a aussi été observée dans les MDA-MB 231 résistantes au paclitaxel par un nouveau mécanisme découvert dans notre laboratoire. Il s'agit de la retyrosination et de la polyglutamylation. Dans ces cellules mammaires de cancer du sein, l'adaptation à long terme au paclitaxel, induite par la surexpression de plusieurs septines, dont la SEPT9\_i1 de mauvais pronostic, met en

évidence une relocalisation des septines de l'actine vers les MTs. Sur les MTs, les septines servent d'échafaudage pour recruter les enzymes impliquées dans la polyglutamylation de la tubuline polymérisée pour réguler finement la longueur des chaînes de glutamate. Ce dialogue septine/MT résulte en un recrutement accru sur le MT du facteur de sauvetage CLIP170 et de la kinésine dépolymérisante MCAK, afin d'augmenter la dynamique microtubulaire, limitant ainsi l'effet stabilisateur du paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Targa et al., 2019).

D'autres MAPs antagonisent l'effet du paclitaxel sur la dynamique des MTs telles que ATIP3 (AT2 receptor-interacting protein), qui est codée par le gène suppresseur de tumeur MTUS1 (Microtubule-associated Tumor Suppressor 1) (Nouet et al., 2004). C'est une MAP stabilisatrice de MTs qui, en entrant en compétition avec EB1 et en l'empêchant de se fixer à l'extrémité en croissance de la lattice, entraîne une diminution de la croissance microtubulaire (Molina et al., 2013 ; Velot et al., 2015). Alors qu'une diminution d'expression d'ATIP3 est associée aux cancers du sein les plus agressifs (Rodrigues-Ferreira et al., 2009) car augmentant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Rodrigues-Ferreira et al., 2009), de façon contre-intuitive, un faible niveau d'ATIP3 est actuellement considéré comme biomarqueur prédictif d'une meilleure efficacité d'un traitement par du paclitaxel (Rodrigues-Ferreira et al., 2020). La déplétion d'ATIP3 améliore les effets pro-apoptotiques du paclitaxel en induisant une aneuploïdie excessive (Rodrigues-Ferreira et al., 2019), indiquant de nouveau que le niveau d'ATIP3 est un réel indicateur de la sensibilité de la tumeur au paclitaxel.

### VI.III.C D'autres mécanismes

Beaucoup d'autres mécanismes de résistance au paclitaxel ont été identifiés. L'équipe de (Ben-Hamo et al., 2019) a montré comment on peut personnaliser les traitements anti-cancéreux en regardant les variants de la séquence du gène Bcl-2 anti-apoptotique normalement ciblé par le paclitaxel. Ils montrent que selon les variants de ce gène, même de l'ordre d'un nucléotide, la sensibilité au paclitaxel varie. Ainsi, l'évaluation de ces variants dans chaque patient permettra de personnaliser les traitements. Le travail de (Ajabnoor et al., 2012) montre qu'en comparant les cellules MCF-7 sensibles à celles résistantes au paclitaxel, des changements dans la réponse à la mort cellulaire ont lieu, contribuant à la résistance. En effet, dans les cellules résistantes, le niveau cellulaire des caspases 7, 8 et de BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death), impliquées dans l'apoptose, est diminué. Une inhibition de BIM seul par siRNA dans les cellules sensibles induit une résistance au paclitaxel. Ainsi, la



résistance au paclitaxel est multifactorielle, et est détaillée dans la revue : (Maloney et al., 2020)

#### VI.IV Les conséquences de la résistance au paclitaxel

Le cancer du sein est la deuxième cause de mortalité chez les femmes. En 2018, plus de 2 millions de femmes, mondialement, ont été atteintes de cancer du sein avec plus de 600 000 décès (Bray et al., 2018). Le paclitaxel utilisé dans des cas précoces et avancés de cancer du sein métastatique possède un taux d'efficacité de 30 à 70% en première ligne (Rivera and Gomez, 2010). Ceci est dû à la résistance innée ou acquise au paclitaxel. Il en va de même pour le carcinome hépatocellulaire (CHC), un autre cancer hautement mortel avec 10 à 20% de cas traités par chirurgie. Le traitement par chimiothérapie est compliqué à cause des mécanismes de résistance. Le paclitaxel administré par perfusion intraveineuse à 175 mg/m<sup>2</sup> pour 3h toutes les 3 semaines n'a pas d'effet significatif sur les tumeurs de patients atteints de CHC (Chao et al., 1998).

La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est donc nécessaire pour augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements par chimiothérapie. Ces nouvelles cibles doivent avoir un effet sélectif sur les cellules cancéreuses avec le moins possible d'effets secondaires affectant les cellules saines.

## Présentation du premier volet du travail

La résistance des cellules tumorales au paclitaxel est fréquente et limite son efficacité. Cette chimiorésistance est multifactorielle et implique différents mécanismes tels que des mutations du gène de  $\beta$ I-tubuline, des modifications d'expression des isotypes de  $\beta$ III- ou  $\beta$ IV-tubuline, ou des altérations d'expression de protéines associées aux MTs. Tous ces mécanismes de résistance mènent à l'augmentation de la dynamique des MTs afin de s'opposer à l'effet stabilisateur du paclitaxel.

Au laboratoire, un nouveau mécanisme de résistance au paclitaxel a été découvert dans les cellules humaines MDA-MB 231 de cancer du sein. Ces cellules qui ont été rendues résistantes au paclitaxel présentent non seulement une surexpression des septines, en particulier celle de l'isoforme 1 de SEPT9 (SEPT9\_i1), mais aussi une relocalisation complète des filaments de septines, de l'actine vers les MTs polyglutamylés (Froidevaux-Klipfel et al., 2011 ; Froidevaux-Klipfel et al., 2015). Il a été démontré que la présence des filaments de septines sur les MTs entraînait le recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 et de la kinésine dépolymérisante MCAK, résultant en une augmentation de la dynamique des MTs, et contrecarrant ainsi l'effet stabilisateur du paclitaxel.

Alors que ce nouveau mécanisme de résistance avait été identifié dans des cellules adaptées au long cours au paclitaxel, la première partie de ma thèse s'est intéressée à analyser l'effet d'un traitement en aigu sur le phénotype de relocalisation des septines qui s'avère être une caractéristique précoce de l'acquisition de la résistance à la drogue. Mes travaux ont été intégrés aux résultats du doctorant précédent et publiés en 2019 dans *Cell Death & Disease*. Ce manuscrit intitulé « Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9\_i1 and tubulin polyglutamylation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel » comprend un premier volet où il a été mis en évidence que la surexpression d'une septine de chaque groupe comme retrouvé au niveau des filaments était suffisante pour induire une résistance dans différentes lignées sensibles dès lors que SEPT9\_i1 était incluse dans ce pool de septines surexprimées. La polyglutamylaton des MTs s'était alors avérée n'être qu'un potentialisateur de ce processus de relocalisation. Ma contribution à ce travail, dans un deuxième volet, a permis de montrer dans au moins deux des lignées cellulaires sensibles, HHL16 et RPE-1 (respectivement des hépatocytes et des cellules épithéliales pigmentaires de

la rétine immortalisées), qu'un traitement aigu de 24h avec des concentrations en paclitaxel d'environ 3 fois l'IC<sub>50</sub> entraîne rapidement une relocalisation complète des filaments de septines, de l'actine vers les MTs, indiquant probablement qu'il s'agit d'un phénomène général. J'ai pu aussi observer que les cellules qui répondaient le plus facilement et le plus rapidement au paclitaxel étaient celles qui avaient un niveau basal élevé de SEPT9\_i1, une isoforme de SEPT9 déjà connue pour être liée à un mauvais pronostic. En effet, dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231 sensibles, qui expriment principalement l'isoforme 3 de SEPT9, un traitement aigu par du paclitaxel n'induit pas de relocalisation des septines. Seules les cellules de cette lignée exposées au long cours à cet agent pharmacologique (MDA-MB 231 résistantes) qui s'étaient adaptées en surexprimant SEPT9\_i1 avaient alors exhibé ce phénotype de relocalisation et étaient devenues résistantes. Ces résultats indiquent que la relocalisation des filaments de septines sur les MTs requiert la présence de SEPT9\_i1 et est un événement précoce clé pour que la résistance au paclitaxel puisse avoir lieu.

ARTICLE

Open Access

# Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9\_i1 and tubulin polyglutamylolation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel

Benjamin Targa<sup>1</sup>, Laurence Klipfel<sup>2</sup>, Isabelle Cantaloube<sup>1</sup>, Joëlle Salameh<sup>1</sup>, Béatrice Benoit<sup>1</sup>, Christian Poüs<sup>1,3</sup> and Anita Baillet<sup>1</sup>

## Abstract

Cancer cell resistance to taxanes is a complex, multifactorial process, which results from the combination of several molecular and cellular changes. In breast cancer cells adapted to long-term paclitaxel treatment, we previously identified a new adaptive mechanism that contributes to resistance and involves high levels of tubulin tyrosination and long-chain polyglutamylolation coupled with high levels of septin expression, especially that of SEPT9\_i1. This in turn led to higher CLIP-170 and MCAK recruitment to microtubules to enhance microtubule dynamics and therefore counteract the stabilizing effects of taxanes. Here, we explored to which extent this new mechanism alone could trigger taxane resistance. We show that coupling septins (including SEPT9\_i1) overexpression together with long-chain tubulin polyglutamylolation induce significant paclitaxel resistance in several naive (taxane-sensitive) cell lines and accordingly stimulate the binding of CLIP-170 and MCAK to microtubules. Strikingly, such resistance was paralleled by a systematic relocalization of septin filaments from actin fibers to microtubules. We further show that this relocalization resulted from the overexpression of septins in a context of enhanced tubulin polyglutamylolation and reveal that it could also be promoted by an acute treatment with paclitaxel of sensitive cell displaying a high basal level of SEPT9\_i1. These findings point out the functional importance and the complex cellular dynamics of septins in the onset of cell resistance to death caused by microtubule-targeting antimetabolic drugs of the taxane family.

## Introduction

Paclitaxel induces cell death, making it a successful drug for anticancer chemotherapy. However, several

superimposed mechanisms of resistance limit the extent of paclitaxel use in therapeutics<sup>1</sup>. A new mechanism contributing to such chemoresistance was uncovered in the laboratory, involving the overexpression of septins coupled to tubulin modifications<sup>2,3</sup>.

Septins are filamentous GTPases involved in a vast array of cellular functions in which they mainly behave as diffusion barriers or as scaffolds<sup>4,5</sup>. In mammals, there are 13 septin genes grouped in four families<sup>6</sup>. Septins arrange into palindromic octamers: SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9, which then can

Correspondence: Christian Poüs ([christian.pous@u-psud.fr](mailto:christian.pous@u-psud.fr)) or Anita Baillet ([anita.baillet@u-psud.fr](mailto:anita.baillet@u-psud.fr))

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 1193, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup>INSERM UMR-S 968, CNRS UMR 7210, Univ. Pierre et Marie Curie Paris 06, Sorbonne Universités, Paris, France

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

These authors contributed equally: Laurence Klipfel, Isabelle Cantaloube  
Edited by A. Stephanou

© The Author(s) 2019



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

assemble into higher structures like filaments, gauzes or rings<sup>7,8</sup>. Each of the septin gene loci can generate several transcripts. The *sept9* locus engenders at least 15 isoforms<sup>9</sup> and the overexpression of SEPT9\_i1, one of the largest isoforms, has already been involved in ovarian cancer tumorigenesis<sup>10</sup>, head and neck cancers<sup>11</sup>, and breast cancer progression<sup>12,13</sup>. In interphase cells, septins can be found on membranes<sup>14,15</sup>, on actin stress fibers<sup>7,16</sup> and/or on microtubules (MTs) in a few cell types<sup>17</sup> where they were proposed to play a role in the regulation of MT guidance and organization<sup>18</sup>.

MT dynamics can be modulated by post-translational modifications (PTMs) of tubulin<sup>19</sup>. The detyrosination/retyrosination cycle<sup>20–22</sup> was involved in breast cancer cell resistance to paclitaxel<sup>23</sup>. Tubulin polyglutamylation (polyE), which was shown to modulate protein interactions with MTs<sup>24,25</sup> and thus to control MT dynamics, consists in the branching and in the elongation of (Glu)<sub>n</sub> side chains on both  $\alpha$ - and/or  $\beta$ -tubulin. It is catalyzed by tubulin tyrosine ligase like (TTL) glutamylases. TLL4, 5, or 7 start the branching by adding a single glutamate whereas the elongation is catalyzed by TLL1, 6, 11, or 13<sup>26,27</sup>.

Previous studies have shown that cell resistance to paclitaxel is a multifactorial process<sup>1,28</sup>. In addition, we have shown previously<sup>2,3</sup> that long-term paclitaxel adaptation of MDA-MB 231 breast cancer cells (paclitaxel-resistant; Tr) resulted in additional changes: (i) in the occurrence of high levels of long-chain polyE and in TTL (Tubulin Tyrosine Ligase)-mediated tubulin retyrosination, (ii) in global septin overexpression together with a partial replacement of SEPT9\_i3 (the main isoform of paclitaxel-sensitive cells; Ts) by SEPT9\_i1, and (iii) in a higher recruitment to MTs of plus end-tracking proteins (+TIPs) that control catastrophes (MCAK) and rescues (CLIP-170). Knocking-down each of these actors led to the reversion of chemoresistance, allowing us to propose this new resistance mechanism. Strikingly, it was paralleled by a dramatic relocalization of septins from actin filaments to MTs in resistant cells<sup>3</sup>.

Here, to determine to which extent this mechanism alone could trigger taxane resistance, we studied the respective contributions of tubulin modifications and of septin overexpression to the chemoresistant phenotype in MDA-MB 231 taxane-sensitive (Ts) and in a variety of naive cells. We found that the most effective set of modifications consisted in the simultaneous overexpressions of TLL5, TLL11, SEPT2, SEPT6, SEPT7 and SEPT9\_i1, and that this combination caused the relocalization of septin filaments from actin to MTs, consistent with the phenotype observed in long-term paclitaxel-adapted cells. We also show for the first time that septin relocalization occurred early in response to acute paclitaxel treatment, and that cell lines that

constitutively express a high level of SEPT9\_i1 were more prone to undergo such a phenotype. Together, these results indicate that septin overexpression and relocalization to MTs is a key event to allow paclitaxel resistance to take place.

## Results

### Paclitaxel resistance is promoted by the overexpression of octamer-forming septins, and is further enhanced by MT polyglutamylation

By RNAi depletion, we previously identified four new factors involved in paclitaxel resistance: TTL, TLLs, septins and +TIPs<sup>3</sup>. Here, in a reverse approach, we investigated which of these actors, alone or in combination, are sufficient to induce a significant level of paclitaxel resistance. As we showed that +TIPs function downstream of tubulin modifications and septins to confer chemoresistance<sup>3</sup>, we focused on the three other factors to determine their role in taxane-resistance acquisition. To this end, we first overexpressed combinations of TLLs and septins in taxane-sensitive (Ts) MDA-MB 231 cells, the cell line from which the long-term paclitaxel-adapted (Tr) cells originated<sup>2</sup>. To determine whether resistance was restricted to breast cancer cells, we also studied cancer cells from other origins (HeLa and HuH7). The study was further extended to immortalized cells (RPE-1) and even to non-human fibroblasts (CHO), to evaluate the universality of the MT-dependent resistance mechanism we uncovered<sup>3</sup>. First of all, transfection efficacy and specificity were verified (Figs. S1 and S2). Drug resistance was determined from experiments that consisted in 72 h-exposure to increasing paclitaxel concentrations followed by measurement of cell survival in MTT assays relative to cells expressing eGFP as a control. Figure 1a.1 shows that the overexpression of TLL5 (branching) and TLL11 (elongating) is not sufficient to cause Ts cells to resist paclitaxel. A low level of resistance was induced when each of the SEPT9 isoforms identified in MDA-MB 231 cells (either SEPT9\_i3 or the bad prognosis SEPT9\_i1 isoform) was overexpressed alone (Fig. 1a.1). When the whole set of filament-forming septins (SEPT2,6,7,9) was overexpressed, especially when it included SEPT9\_i1 (Fig. 1a.3) or when MT polyglutamylation was enhanced in the case of the presence of SEPT9\_i3 (Fig. 1a.2), a proportion of Ts cells resisted paclitaxel up to ~10 nM. The overexpression of the SEPT9\_i1 isoform together with that of other septins enhanced cell resistance to paclitaxel to an intermediate level, and resistance was even higher when septin overexpression was combined with that of polyglutamylation enzymes (Fig. 1a.3 and 1a.4). To reinforce the significance of the above MTT assays, we further verified that the overexpression of septins in association or not with polyglutamylases limits

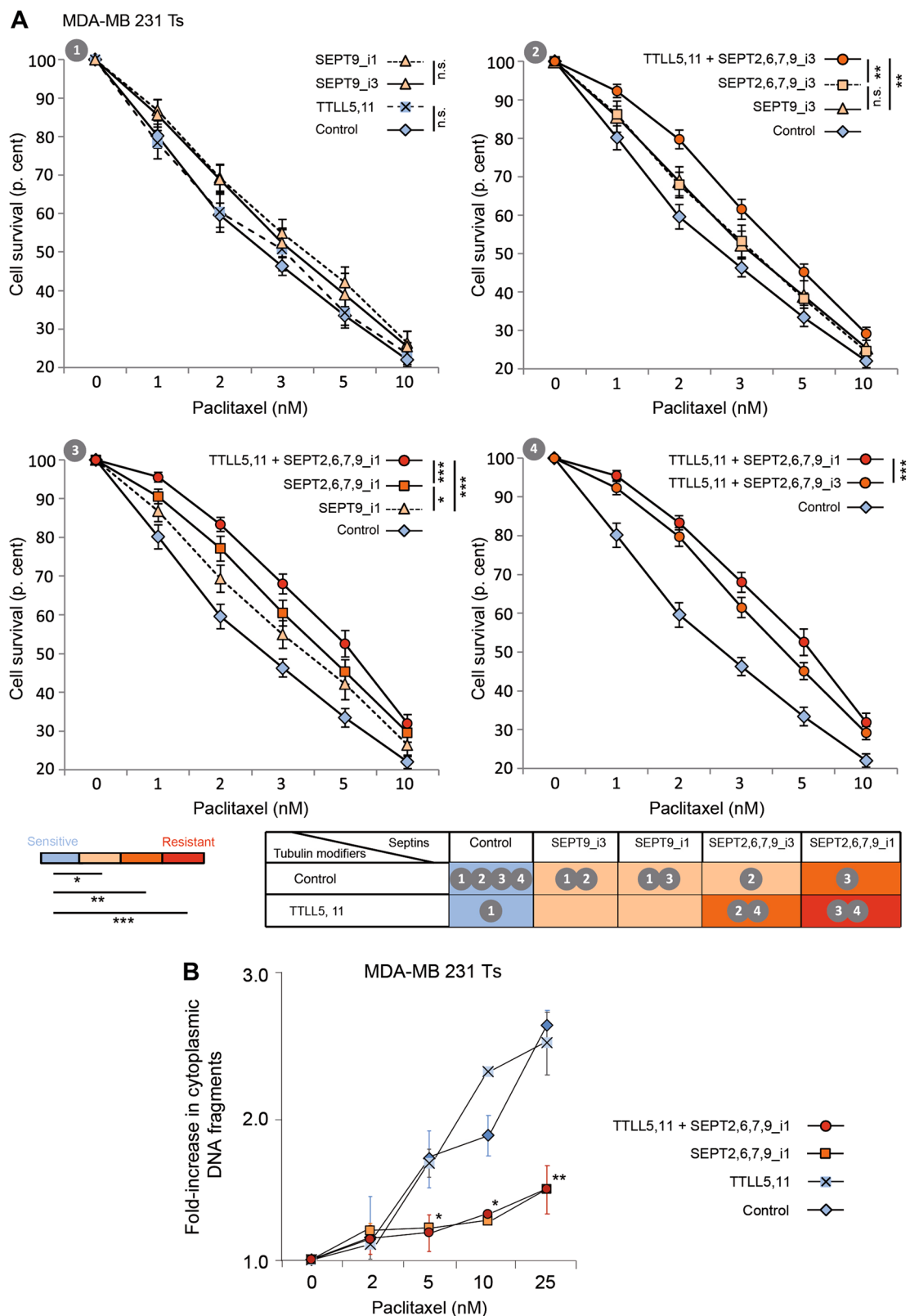


Fig. 1 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

**Fig. 1 The overexpression of a SEPT9\_i1-containing set of filament-forming septins is necessary and sufficient to confer paclitaxel resistance, and is further enhanced upon microtubule polyglutamylolation.** **a** MTT assays were conducted in paclitaxel-sensitive (Ts) MDA-MB 231 cells in conditions that enhanced either tubulin long-chain polyglutamylolation (overexpression of the branching TLL5 and elongating TLL11 enzymes) or overexpression of a septin pattern including SEPT9\_i1 or\_i3, or both. After a 72h-exposure to the paclitaxel concentrations indicated, cell survival was measured. Each point is the mean  $\pm$  s.e.m. of at least 10 independent experiments. Statistical analysis is based on the overall comparison of the curves  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ . Statistical significance of the comparisons with the negative control is color-coded as indicated. The colors also correspond to the additional percentages of cell survival compared to those of control cells at the  $IC_{50}$ : absence of resistance (blue), low level of resistance (light orange,  $\leq 10\%$ ), intermediate level (orange, between 10 and 20%) and high level of resistance (red,  $>20\%$ ). The table summarizes the effect (color-coded) of each effector alone or in combination, and indicates the panel(s) displaying the data. **b** MDA-MB 231 Ts cells were subjected to the overexpression of the indicated plasmids and cell death was quantified 24 h after exposure to paclitaxel by measuring the cytoplasmic release of histone-associated DNA fragments relative to the values without paclitaxel. Each point is the mean  $\pm$  s.e.m. of at least three independent experiments.  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$

the release of DNA fragments in the cytoplasm, reflecting the reduction in apoptotic cell death (Fig. 1b).

Overexpressing TTL alone also caused cells to resist paclitaxel to an intermediate level (Fig. 2.1). Note that combining TTL overexpression with that of septins alone, whatever the SEPT9 isoform (Fig. 2.1), or with that of the polyglutamylases TLL5 and 11 did not further enhance Ts cells resistance (Fig. 2.2 and 2.3). When SEPT9\_i1 was included in the combination, overexpressing TTL on top of TLLs even had a negative effect on resistance (Fig. 2.3). In our model of taxane resistance, TTL was an important upstream actor to allow effective long-chain polyglutamylolation of tubulin and septin recruitment to MTs<sup>3</sup>. The fact that TTL overexpression failed to increase the resistance conveyed by TLL and septin overexpression revealed that overexpressed TLLs bypassed the need for TTL to stimulate long-chain polyE. It also indicated that TTL conferred some level of taxane resistance independently from the polyE/septins pathway, in keeping with the notion that tubulin tyrosination is required for the recruitment of CLIP-170 and MCAK on MTs<sup>29,30</sup>.

The same viability assays were repeated in RPE-1, HeLa, CHO and HuH7 cells, which are all sensitive to paclitaxel as evidenced by their respective  $IC_{50}$  (Fig. 3a, top panel). MTT cell survival assays were conducted in four different conditions according to the levels of septin expression and of tubulin polyglutamylolation: Control, TLL5,11, SEPT2,6,7,9\_i1 and TLL5,11 + SEPT2,6,7,9\_i1. Except for HuH7 hepatoma cells, which displayed low to intermediate resistance only at very low concentrations of paclitaxel (1 nM and 2 nM, respectively), each of the other cell lines behaved like MDA-MB 231 Ts cells (Figs. 3b, c and S3). They resisted paclitaxel when the whole set of polyglutamylolation enzymes and septins was overexpressed. The overexpression of septins alone caused a milder resistant phenotype. Regarding polyglutamylase overexpression, it consistently failed to cause resistance, except perhaps in CHO and HuH7 cells at 2 nM paclitaxel (Fig. 3c). Figure 3a (bottom panel) shows the relative

increases in  $IC_{50}$  for paclitaxel, as determined from the responses to MTT cell survival assays (Fig. 3b, c).

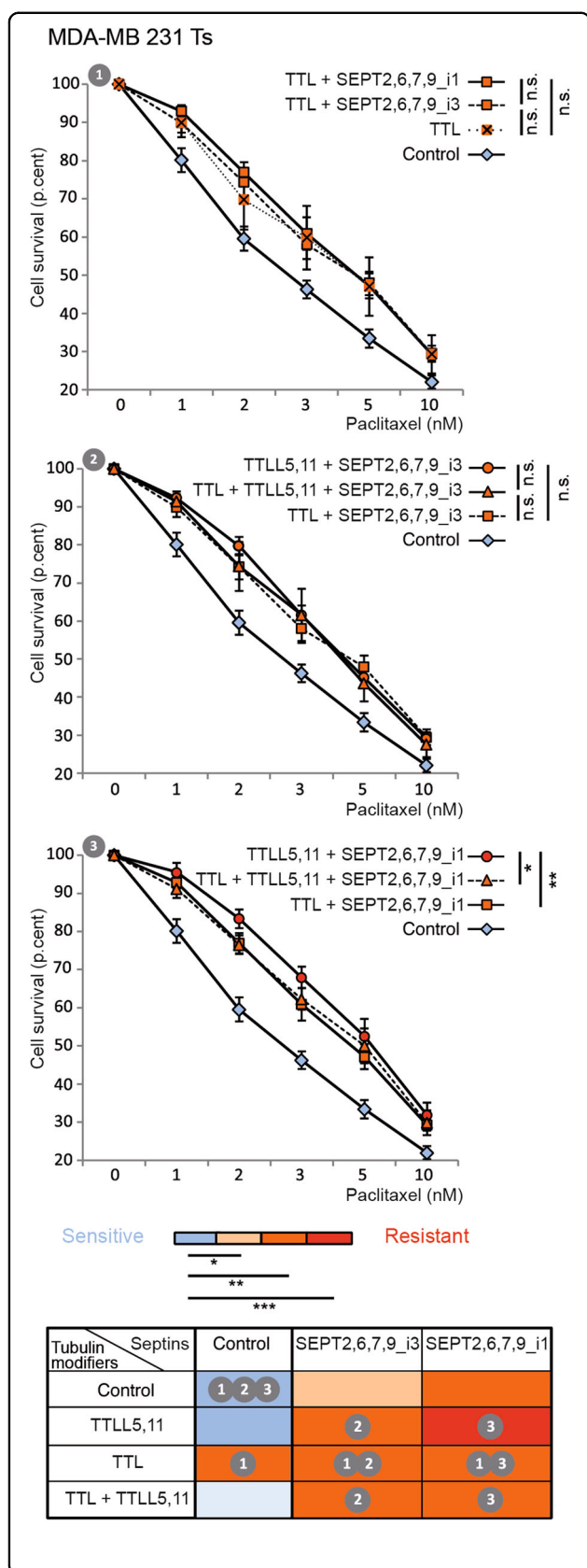
#### Septins and tubulin polyglutamylolation contribute to CLIP-170 and MCAK recruitment to MTs

We previously showed in our Tr model<sup>3</sup> that the increase of CLIP-170 and MCAK on MTs contributed to chemoresistance, downstream of tubulin modifications and septin recruitment to MTs. As tubulin tyrosination is a key factor to allow the binding of these +TIPs to MTs<sup>29,30</sup>, we next wondered whether tubulin polyglutamylolation and/or septins also contributed to this recruitment. In a way that paralleled what we observed above for the induction of paclitaxel resistance, Ts cells overexpressing the combination of TLL5,11 alone did not display a higher recruitment of CLIP-170 and MCAK in MT fractions (Fig. 4a). In contrast, overexpressing a combination of septins (SEPT2,6,7,9\_i1) increased CLIP-170 and MCAK levels in the MT fractions. This effect was even higher when long-chain tubulin polyglutamylolation was stimulated in parallel (Fig. 4a). Note that these phenotypes occurred while TTL was not overexpressed, suggesting that an increased recruitment of these +TIPs is also stimulated by septin recruitment on MTs. Increased levels of CLIP-170 and MCAK in the MT fractions were also observed in the RPE-1 cell line (Fig. 4b), confirming that the overexpression of septins combined with that of polyglutamylases may cause an enhanced recruitment of these proteins not only in cancer cells.

#### The combined overexpression of septins and of polyglutamylolation enzymes that optimizes paclitaxel resistance causes the relocalization of septin filaments to MTs, independently of paclitaxel stimulation

Another striking phenotype that distinguished Ts from Tr cells is the subcellular localization of septin filaments that shifted from actin fibers to MTs, respectively (ref. <sup>3</sup> and Fig. 5a). Furthermore, SEPT9\_i1 expression was





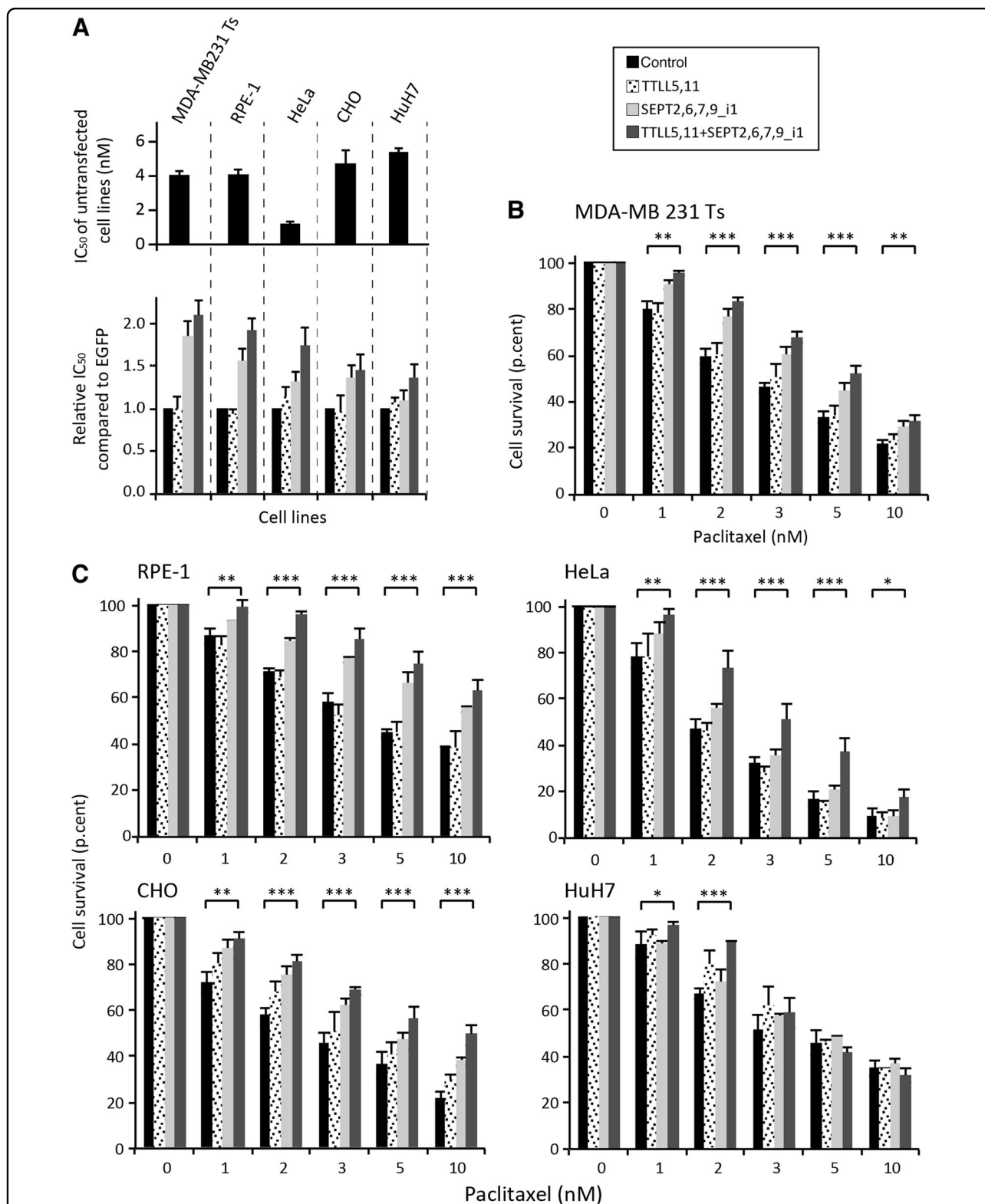
**Fig. 2 TTL overexpression does not enhance paclitaxel resistance induced by the overexpression of septins and polyglutamylases.**

MTT assays were conducted in paclitaxel-sensitive (Ts) MDA-MB 231 cells in conditions that enhanced or not tubulin retyrosination (overexpression of the Tubulin Tyrosine Ligase TTL) combined with increased tubulin long-chain polyglutamylation (overexpression of TTLL5 and TTLL11 enzymes) or overexpression of a septin set including SEPT9\_i1 or\_i3, or both. Each bar is the mean ± s.e.m of at least 10 independent experiments. Statistical analysis is based on the overall comparison of the curves \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01, \*\*\**p* ≤ 0.001. Statistical significance of the comparisons with the negative control is color-coded as indicated. The colors also correspond to the additional percentages of cell survival compared to those of control cells at the IC<sub>50</sub>: absence of resistance (blue, ≤10%), low level of resistance (light orange, ≤10%), intermediate level (orange, between 10 and 20%) and high level of resistance (red, >20%). The table summarizes the effect (color-coded) of each effector alone or in combination, and indicates the panel(s) displaying the data

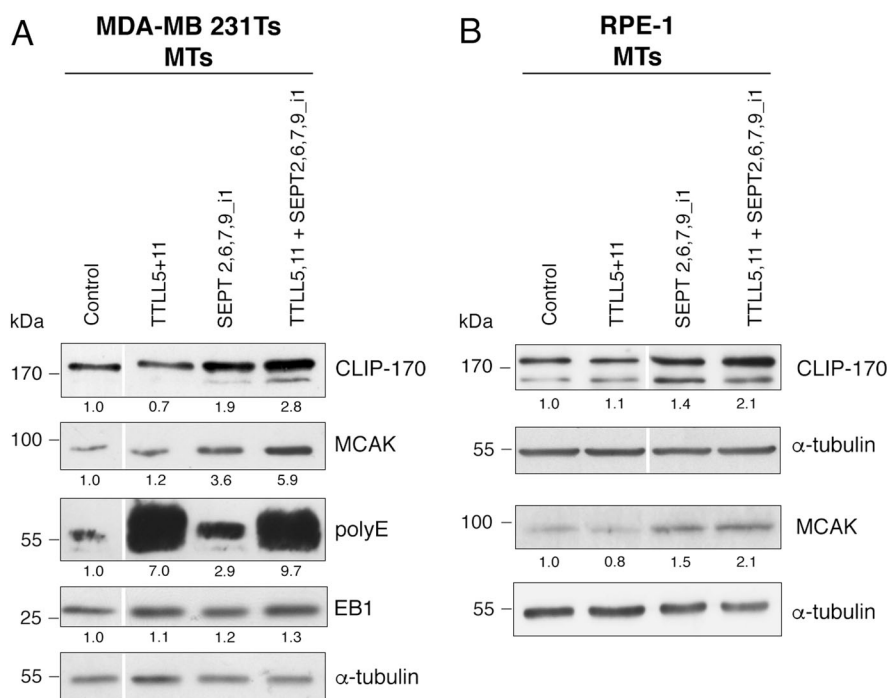
increased in Tr cells while SEPT9\_i3 was the main SEPT9 isoform in Ts cells. Also, SEPT9\_i1-enriched septin filaments are associated with MTs that bear long polyglutamate side chains in resistant Tr cells<sup>3</sup>. We wanted to determine to which extent this change of localization resulted from the induction of tubulin polyglutamylation and/or from the expression of a specific SEPT9 isotype.

We thus tested which of tubulin long-chain polyglutamylation and/or septin overexpression (including SEPT9 isoform variation) was required to make the endogenous septin filaments coalign with MTs. As shown in Fig. 5b, the stimulation of tubulin polyglutamylation alone was not sufficient to displace septin filaments from actin fibers to MTs. Next, all the conditions in which SEPT9 alone (either the\_i1 or the\_i3 isoform) was overexpressed, in combination or not with the polyglutamylation enzymes, also failed to relocalize endogenous septin filaments, indicating that SEPT9 (even the\_i1 isoform which can physically interact with tubulin<sup>31</sup>) does not have a role by itself in this change of septin subcellular localization. Moreover, as the overexpression of an individual septin may form artifactual homooligomers<sup>32</sup> and mimic physiological filament coalignment with MTs, we also overexpressed SEPT9 isoforms together with other filament-forming septins and followed total SEPT2 (endogenous and overexpressed) by immunofluorescence to actually reflect the behavior of endogenous septin filaments. In these conditions, when filament-forming septins included SEPT9\_i1, a partial relocalization of septin filaments to MTs could be observed, mostly on perinuclear MTs forming bundles (Fig. 5b). This relocalization was complete when septin overexpression was combined with effective long-chain polyglutamylation that resulted from the overexpression of both TTLL5 and TTLL11 (Fig. 5b). The latter





**Fig. 3 Long-chain polyglutamylation of tubulin and septin overexpression are necessary and sufficient to confer paclitaxel resistance to multiple cell lines.** **a** The IC<sub>50</sub> for paclitaxel of untreated paclitaxel-sensitive (Ts) MDA-MB-231 cells, RPE-1, HeLa, CHO and HuH7 cells or in conditions that enhanced either tubulin long-chain polyglutamylation or septin pattern overexpression including SEPT9\_i1 or both, were measured using MTT assays with drug concentrations ranging from 0 to 100 nM paclitaxel. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of at least four independent experiments. **b, c** MTT assays were conducted in paclitaxel-sensitive (Ts) MDA-MB-231 cells, RPE-1, HeLa, CHO, and HuH7 cells in conditions that enhanced either tubulin long-chain polyglutamylation or septin pattern overexpression including SEPT9\_i1, or both. After a 72h-exposure to the paclitaxel concentrations indicated, cell survival was measured. Each bar is the mean  $\pm$  s.e.m. of at least four independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$



**Fig. 4 Overexpression of a SEPT9\_i1-containing set of septins stimulates the recruitment of CLIP-170 and MCAK to microtubules, which is amplified by long-chain tubulin polyglutamylation.** MT fractions from Ts (a) or RPE-1 (b) cells subjected to TLL and/or septin overexpression as indicated were analyzed for the recruitment of various +TIPs (EB1, CLIP-170, and MCAK). The polyE antibody recognizes glutamate chains composed of at least three glutamic acids. The polyE signal is therefore a reflection of elongating TLL activity. Tubulin was used as a loading control. The quantitative data are the ratio of the intensity of the protein of interest to that of  $\alpha$ -tubulin for the blot shown

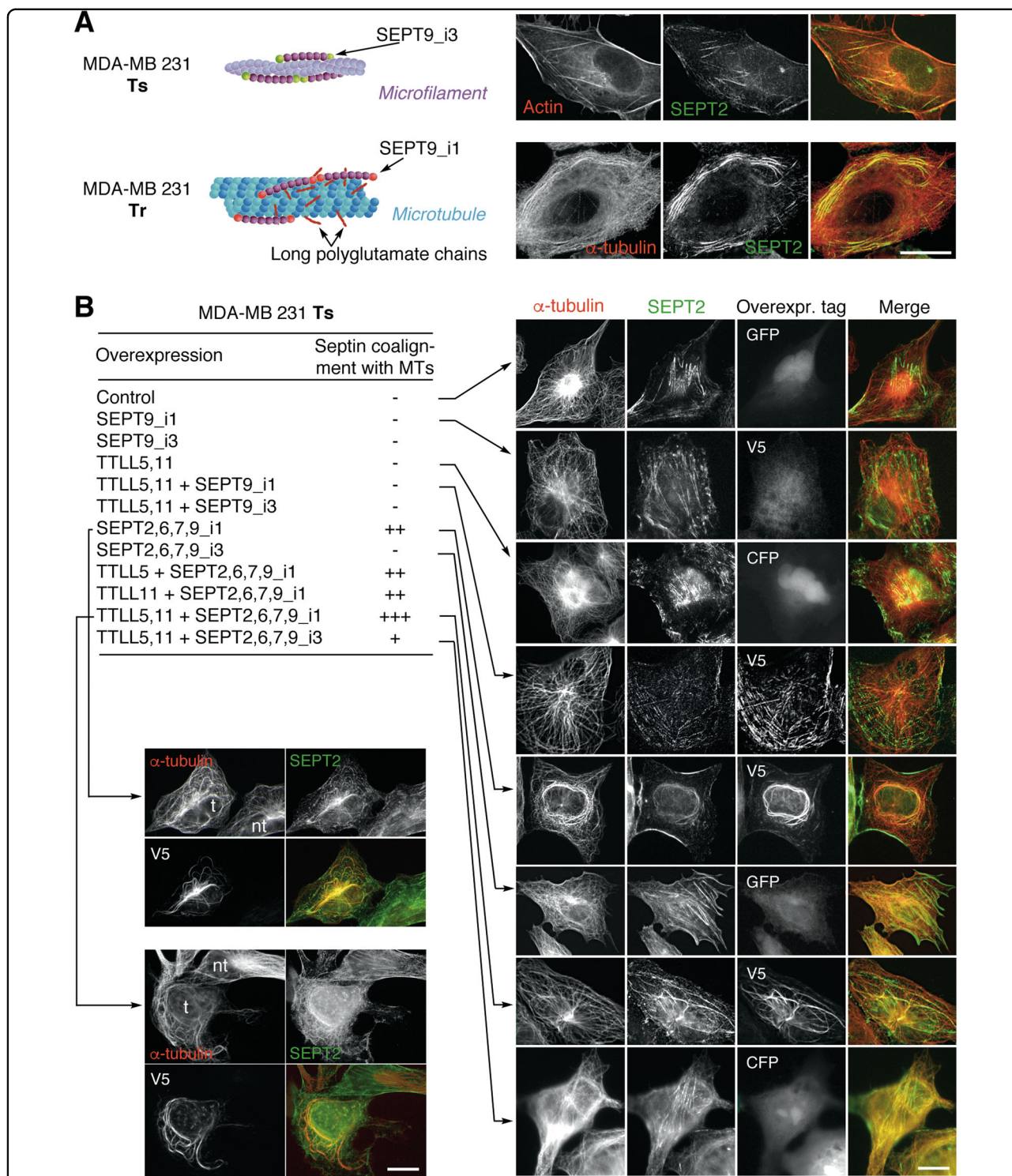
situations contrasted with the conditions that comprised SEPT9\_i3. In these cases, overexpressing septins alone did not allow septin filaments to relocalize from actin fibers to MTs (Fig. 5b), and combining the overexpression of this septin profile with long-chain polyglutamylation only moderately caused septin filaments to coalign with MTs, which is also in accordance with the lower level of resistance shown by cell viability data (see Fig. 1, right panels).

The functional importance of combining long-chain tubulin polyglutamylation and SEPT9\_i1 expression to trigger septin coalignment with MTs was further verified in other cell types. As shown in Fig. 6, the relocalization of endogenous septin filaments was also observed in RPE-1, HeLa and CHO cells, the same 3 cell lines in which paclitaxel resistance could be significantly induced (see Fig. 3c). Consistent with this parallel between paclitaxel resistance and septin relocalization, HuH7 cells, which only resisted very low concentrations of paclitaxel (see Fig. 3c), did not exhibit a displacement of their septin filaments to MTs, as visualized by the labelling of SEPT2 (Fig. 6, bottom line).

#### Cells that survive acute paclitaxel treatment exhibit MT-bound septins

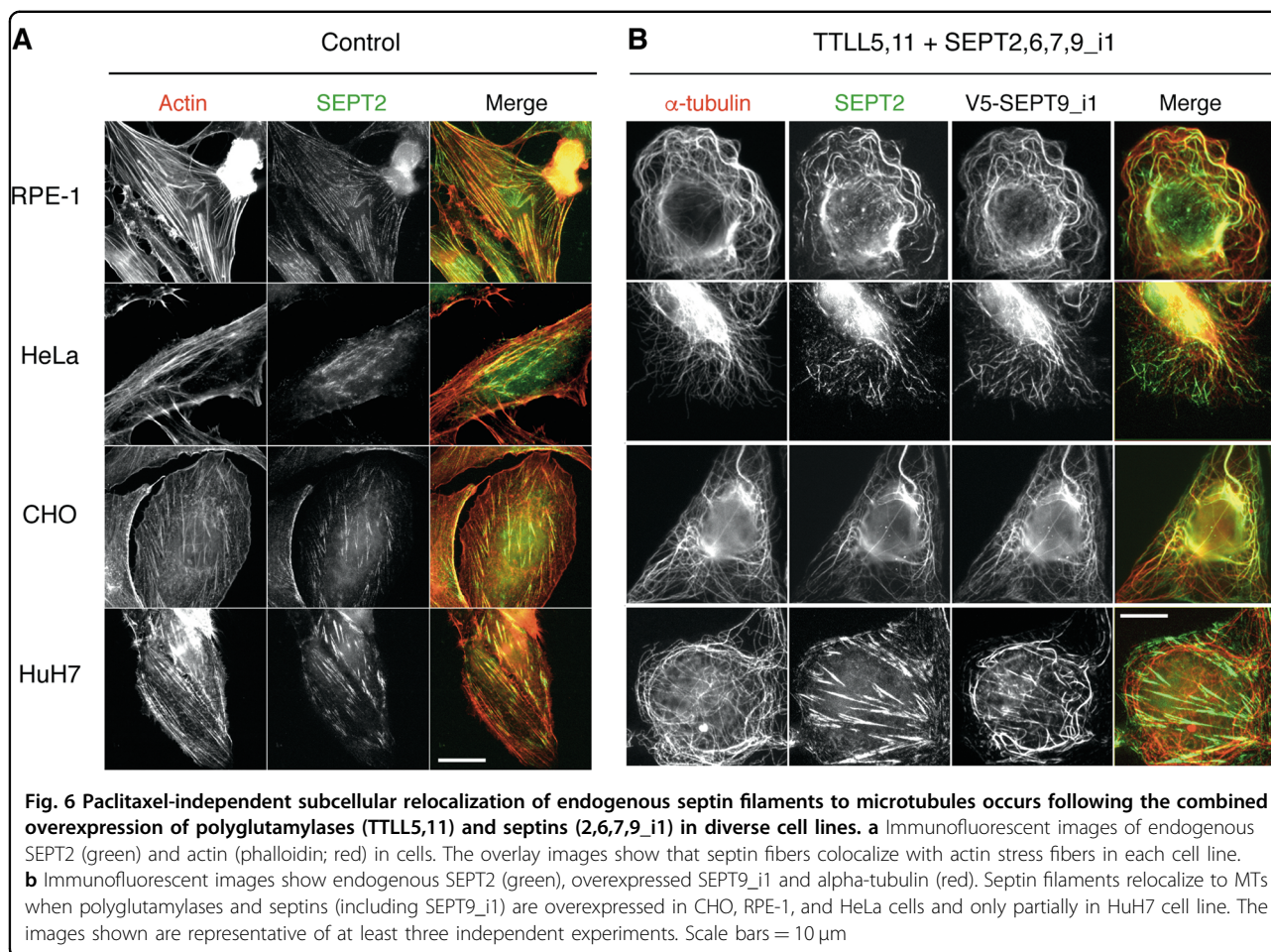
Our above results show that septin relocalization triggered by septin overexpression (including SEPT9\_i1) in a

context of long-chain tubulin polyglutamylation was well correlated with cell survival to a 72 h exposure to paclitaxel. To confirm that this change in septin subcellular location could be actually causative of the onset of a cell resistance, we treated different untransfected cell lines using 24 h acute treatment with paclitaxel at a concentration three-times higher than their respective  $IC_{50}$ . Figures 7a, d, S4 and S5 show that, except for MDA-MB 231 Ts, a partial or complete relocalization of septin filaments occurred from the actin cytoskeleton to the MT network. As this relocalization seems to be a general feature of cancer and non-cancer cell response to acute paclitaxel treatment, we further analyzed this cytoskeleton reorganization in the two RPE-1 and HHL16 immortalized cell lines that were both good responders to paclitaxel and easy to image. We next eliminated the hypothesis that the change in septin location could originate from enhanced septin expression following paclitaxel treatment (Fig. 7b). It is worth noting, especially in RPE1 (Fig. 7a) or HeLa (Fig. S5) cells, that the relocalization of septins to MTs is accompanied by a loss of thick actin stress fibers. This is in agreement with the role of septins in stabilizing actin fibers<sup>33</sup>. We also noticed that the higher the concentration of paclitaxel we used, the faster septins relocalized to MTs (Data not shown).



**Fig. 5 Paclitaxel-independent septin relocation from actin fibers to microtubules is complete upon the overexpression of SEPT9\_i1-containing set of septins combined with long-chain polyglutamylation in the MDA-MB 231 breast cancer cell line.** **a** Subcellular localization of septin filaments in the paclitaxel-sensitive (Ts) and -resistant (Tr) MDA-MB 231 cell lines. Septin filaments associated with actin fibers in Ts cells mainly comprise SEPT9\_i3, while SEPT9\_i1 is the main long SEPT9 isoform recovered in septin filaments, which are associated with long-chain polyglutamylated MTs in paclitaxel-adapted Tr cells<sup>3</sup>. Endogenous SEPT2 was used to reveal the localization of septin filaments in Ts and Tr cells. **b** Subcellular septin localization in Ts cells overexpressing various combinations of septins and TTLL enzymes alone or in association. SEPT2 labelling was used to detect endogenous septin filaments. With the exception of SEPT9\_i1, which bears the V5 tag, all septins are GFP-tagged. TTLL enzymes are coexpressed with CFP. The bottom-left panels show examples of differential septin localization in transfected (t) versus non-transfected (nt) cells in the same field. The images shown are representative of at least three independent experiments. Scale bars = 10  $\mu$ m





Measuring the time-course of cell survival in both RPE-1 and HHL16 cell lines showed that strikingly, all the cells that survived the two highest concentrations of paclitaxel, exhibited septin filaments coaligned with their MTs (Fig. 7c), further indicating that when it actually occurs, this septin relocation plays a key role in cell survival/resistance to paclitaxel treatment. As long-term adapted MDA-MB 231 Tr cells exhibit an elevated level of SEPT9\_i1 compared to their sensitive counterpart Ts<sup>3</sup>, the differential behavior between MDA-MB 231 Ts, HuH7 and the other cell lines is likely to originate from differences in the basal level of SEPT9\_i1. Indeed, all the cell lines that displayed strong septin relocation after paclitaxel treatment actually exhibited a high basal level of SEPT9\_i1 expression (Fig. 7e, f). The low basal level of SEPT9\_i1 expression in HuH7 and its absence in MDA-MB 231 Ts cells correlates well with their respective partial or barely detectable relocation of septin filaments to MTs (Fig. 7f). In addition, short-term paclitaxel treatment failed to stimulate SEPT9\_i1 expression in MDA-MB 231 Ts and HuH7 cells, pointing out that a high basal level is determinant to induce such a quick

relocation, whether the cells are cancerous or not. This result also suggests that cell lines with a low basal level of SEPT9\_i1 expression might need a longer adaptation to resist the drug.

## Discussion

Cancer cell resistance to taxanes is a multifactorial process that involves a great variety of cellular adaptation means<sup>1,28</sup>. We previously uncovered a new septin- and tubulin polyglutamylation-dependent mechanism that contributes to long-term cell adaptation to taxanes<sup>3</sup>. While the inhibition of each of these actors partially restored paclitaxel sensitivity<sup>3</sup>, here we sought to determine to which extent they were sufficient to trigger resistance in various paclitaxel-naive cells. We show that modifying tubulin alone failed to cause resistance. In contrast, overexpressing a set of filament-forming septins (SEPT2,6,7,9), especially when it comprised SEPT9\_i1, was sufficient to cause significant paclitaxel resistance that was further enhanced upon the induction of MT polyglutamylation. Strikingly, this resistance appeared to be tightly linked to the early relocation of septin filaments

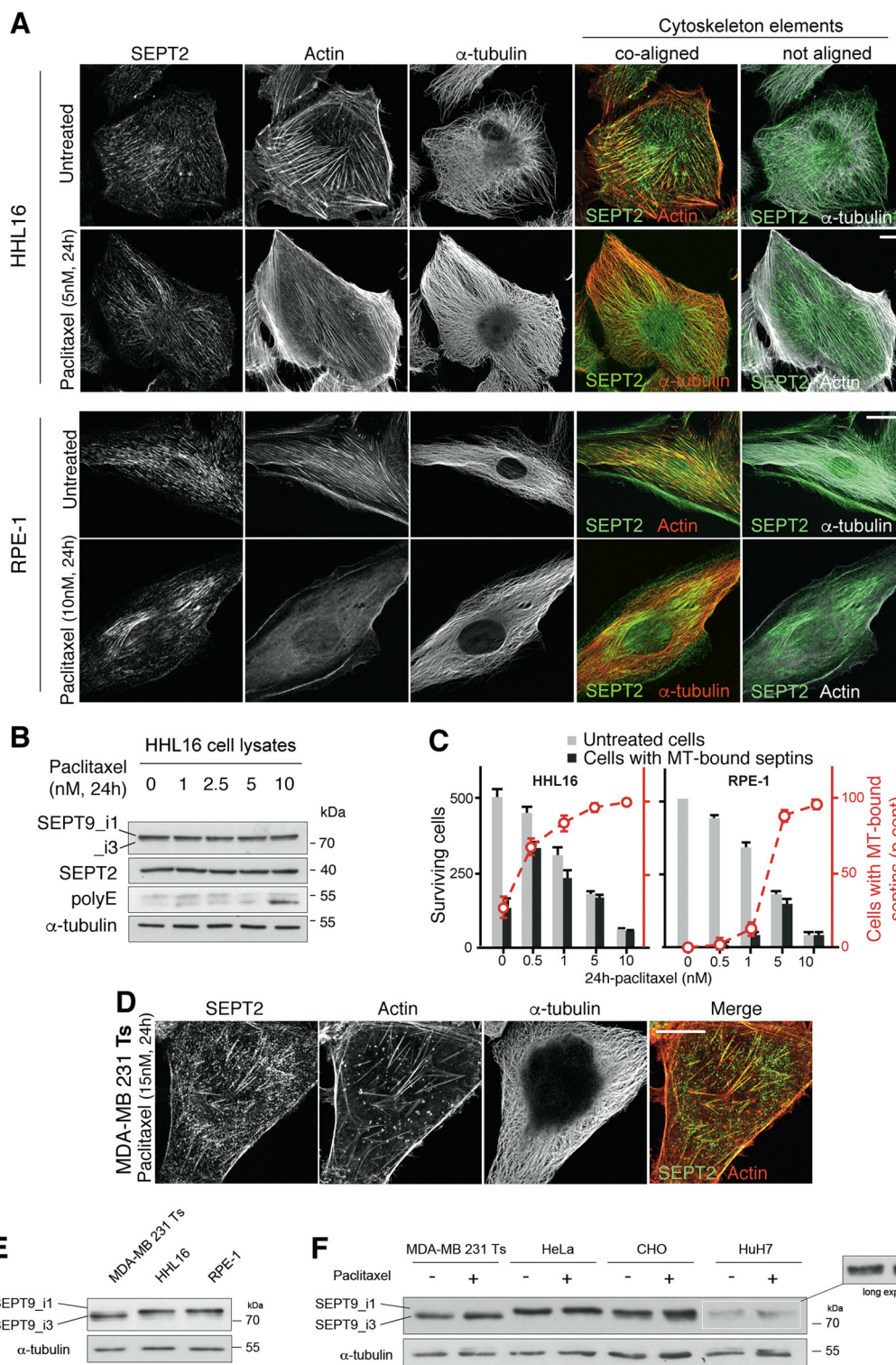


Fig. 7 (See legend on next page.)



(see figure on previous page)

**Fig. 7 Cells that survived acute paclitaxel treatment exhibit subcellular relocalization of endogenous septin filaments to microtubules.**

**a** Immunofluorescent images of endogenous SEPT2 (green), actin (phalloidin; red or white) and  $\alpha$ -tubulin in HHL16 and RPE-1 cells following 24 h paclitaxel treatment. The overlay images show that septin coalign with actin fibers in untreated cells, and with tubulin in paclitaxel treated cells. The paclitaxel concentration used corresponds to three times the  $IC_{50}$  for the drug. **b** Septin cellular amount does not change upon treatment with increasing concentrations of paclitaxel. Note that tubulin polyglutamylation starts increasing only after 24 h of 10 nM paclitaxel treatment. **c** Quantification of cells with MT-bound septins among cells that have survived 24-h-paclitaxel treatment. **d** Immunofluorescent images of breast cancer MDA-MB 231 cells after 15 nM paclitaxel treatment for 24 h. Note that septin filaments are still mainly associated with actin fibers in these cells. **e** Immunoblot showing the basal levels of SEPT9 long isoforms (SEPT9\_i1 and \_i3) in total cell extracts of untreated sensitive MDA-MB 231 Ts, HHL16, and RPE-1 cells. **f** Immunoblot showing the basal levels of SEPT9\_i1 and \_i3 in total cell lysates of untreated or paclitaxel-treated MDA-MB 231 Ts, HeLa, CHO, and HuH7 cells. The images, immunoblots shown and cell quantifications are representative of at least three independent experiments. Scale bars = 10  $\mu$ m

from actin fibers to MTs, as shown upon acute paclitaxel treatment.

Tubulin polyglutamylation is a complex modification<sup>34</sup>, which plays an important role in neuropathology as shown in mice defective for a glutamate chain-reducing enzyme (CCP1), which display Purkinje cell degeneration<sup>35,36</sup>. A link between tubulin polyglutamylation and cancer cell resistance to MT-targeting agents has already been proposed in estramustine-resistant prostatic cancer cells<sup>37</sup>, but no mechanism was proposed to explain it.

Septin filaments, which have been identified as a new cytoskeleton element<sup>38</sup>, may display a great variety of subcellular organizations according to the organelle or structure they associate with. Apart from their assembly on membranes of specific curvature and lipid composition<sup>39</sup> or their ability to form free rings in the cytoplasm<sup>7</sup>, they also associate with cytoskeleton components, mostly with actin filaments<sup>16,40,41</sup> and with MTs in a few cell types<sup>7,17,42,43</sup>. The control of septin subcellular localization may thus regulate key cellular functions<sup>44,45</sup>. When septins are associated with actin microfilaments, they may impact on cell morphology, actin cytoskeleton organization, and cell migration<sup>46–48</sup>. They would function by crosslinking actin microfilaments in stress fibers, protecting them against depolymerization<sup>33</sup>. In agreement with this role, we observed that upon acute paclitaxel treatment, thick actin stress fibers disappear when septin filaments relocalized to MTs (see Fig. 7a). When coaligned with MTs, septins contribute to promote cell asymmetry<sup>49</sup>. Indeed, in polarized epithelial cells, post-Golgi trafficking operates along polyglutamylated MT tracks that bear septins<sup>50</sup>. Septins can also enhance MT dynamics by preventing the binding of the stabilizing protein MAP4 to MTs<sup>51</sup> and/or by enhancing the recruitment of the rescue-promoting and catastrophe-promoting factors CLIP-170 and MCAK, respectively (ref<sup>3</sup> and this study). We further show now that septin relocalization to MTs is linked to the early development of paclitaxel resistance.

Septin expression is modulated in pathology including in cancer<sup>4,6,52</sup>. Some septins like SEPT2, SEPT8, SEPT9, and SEPT11 are often overexpressed while SEPT4 and

SEPT10 are frequently downregulated<sup>5,53</sup>. Many cancers also display differences in the level of SEPT9 isoform expression<sup>54</sup>. SEPT9\_i2, SEPT9\_i3, and SEPT9\_i4 are often downregulated<sup>13,55</sup> while SEPT9\_i1 and SEPT9\_i5 are overexpressed in various human tumors<sup>10–13,56</sup>. In our experiments, we observed a perfect correlation between the efficacy of early relocalization of septin filaments to MTs and the basal level of SEPT9\_i1 expression (Fig. 7a–f and Fig. S5). SEPT9\_i1 has already been proposed to be a marker of bad prognosis<sup>11,57</sup> and to correlate with cell resistance to MT-disrupting agents<sup>58</sup>. The mechanisms proposed thus far include a role for SEPT9\_i1 in the control of HIF-1 $\alpha$  nuclear translocation and transcriptional effects<sup>59,60</sup> or in a putative stimulation of MT dynamics through a delay in JNK degradation<sup>61,62</sup>. The latter effect could also contribute to cell adaptation to the MT-stabilizing action of taxanes. In addition, the SEPT9\_i1-facilitated relocalization of septin filaments to MTs (this manuscript) could represent another means of modulating MT dynamics as recently shown in vitro<sup>63</sup> and as observed in our long-term adapted cells<sup>3</sup>. Even though all cell types may adapt to taxanes following long-term exposure to paclitaxel as exemplified in our Tr cells<sup>2,3</sup>, the basal level of SEPT9\_i1 could thus be predictive of the easier emergence of cell resistance to taxanes, especially upon acute treatments. Moreover, the fact that a broad range of cells express a sufficient level of SEPT9\_i1 suggests that this mechanism could be relevant not only in cancer cells but also in any other tumor-associated cells.

Some molecular determinants of septin association with cytoskeleton elements have been identified, but the reasons for which septins associate with either cytoskeleton element are still far from clear. It has been shown that septins may bind directly to actin filaments<sup>64</sup> or to actin-associated proteins like non-muscular myosin II<sup>41</sup> or anillin<sup>7</sup>. SEPT9 can directly interact with F-actin<sup>33</sup> via its N-terminal region. The same region is also involved in the interaction with tubulin through basic motifs present in the long isoforms of SEPT9 (SEPT9\_i1, \_i2 and \_i3)<sup>31</sup>. SEPT9\_i1 but not SEPT9\_i3, when overexpressed with other octamer-forming septins, can specifically contribute

to endogenous septin filament binding to MTs, and especially when the latter are polyglutamylated (these data). In spite of the minor sequence differences between the three long SEPT9 isoforms, SEPT9\_i2 was recently shown to limit tumorigenicity contrary to SEPT9\_i1<sup>55</sup>. SEPT9\_i1 only differs from SEPT9\_i3 by the presence of an additional 17-aminoacid sequence at its N-terminus and by its next eight aminoacids, which makes SEPT9\_i1 to bear five more positive charges than SEPT9\_i3. Such difference would favor SEPT9\_i1 over the other long isoforms for interacting with the acidic tail of tubulin, and even more when tubulin bears long polyglutamate chains. Such interaction could be a cause of septin filament retention on the MTs of a variety of cells, making them develop a resistance to low concentrations of paclitaxel.

However, it is likely that other proteins are involved in stimulating septin interaction with MTs. Indeed, SEPT9\_i1 is necessary but not sufficient to relocalize septin filaments to MTs, as high basal levels of SEPT9\_i1 alone do not cause septins to coalign with MTs, as illustrated in RPE-1 or HHL16 cells (Fig. 7). Cell exposure to paclitaxel is also needed to trigger this relocalization. The molecular determinants of septin compartmentalization may involve a complex interplay between MTs, septin filaments including SEPT9\_i1, and actin filaments, which will deserve further exploration, with a special emphasis on Borg proteins, which were evidenced to reinforce the binding between septin and actin filaments in non-dividing cells<sup>65</sup>. Some motors may also be involved as the EB1-binding kinesin KIF17 has been shown to bind SEPT9<sup>66,67</sup>. Targeting this re-localization process would be a valuable approach to limit cell adaptation and resistance to cancer chemotherapies using MT poisons in the future.

## Materials and methods

### Cell culture and treatments

Experiments were performed with human cancer cells: MDA-MB 231 (breast), HeLa (cervix), HuH7 (hepatoma), human immortalized cells: RPE-1 (retinal epithelium), HHL16 (hepatocytes), or Chinese Hamster Ovary fibroblasts (CHO). All cell lines were cultured with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco™, Fisher Scientific, Illkirch, France) containing an antibiotic-antifungal mixture and supplemented with 10% fetal calf serum (GE Healthcare HyClone™, Fisher Scientific), 1% sodium pyruvate and 1% L-Glutamine for all the cell lines except MDA-MB 231 (2%). The paclitaxel-resistant (Tr) and -sensitive (Ts) sublines of the human breast carcinoma cell line MDA-MB 231 were continuously cultured without (Ts) or with 25 nM paclitaxel (Tr) as previously described<sup>2</sup>. When appropriate, cells were treated with different

concentrations of paclitaxel (Sigma, Darmstadt, Germany) for 24, 48 or 72 h.

### Cell transfections

Transfections of RPE-1 and HuH7 cells were performed 48 h or 72 h prior to analysis using X-tremeGENE while those of Ts, HeLa, and CHO cells were done with Turbofect (ThermoFischer, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. Note that the HHL16 cell line was not used in these experiments because they are hard to transfect. Plasmids were used alone or up to a combination of six but the maximal amount of total DNA used per well (6-well plate, 50% confluence) never exceeded 1.5 µg. The amounts of plasmids were determined from the measurements of the efficacy of transfection of the combination involving the six plasmids of interest (SEPT2, SEPT6, SEPT7, SEPT9\_i1 or SEPT9\_i3, TLL5, and TLL11; Fig. S1). Importantly, the same individual amounts were used in every transfection experiment even when the plasmids were used alone. The pEGFP plasmid (Addgene) was used as a negative control. GFP-TLL, CFP-TLL5, and CFP-TLL11 expression vectors were kind gifts of Dr. C. Janke (Institut Curie, Orsay, France). GFP- and His-tagged septins (SEPT2, 6, 7 or 9\_i3) and V5-SEPT9\_i1 were kindly provided by Pr W. Trimble (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) and Dr. A. Gassama (CHB Paul Brousse, Villejuif, France), respectively.

### Cell viability assays

Twenty-four hours after cell transfection or not, sensitivity to paclitaxel was measured using either 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) cytotoxicity assay after 72 h exposition to increasing concentrations of paclitaxel, or the Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> assay, according to the manufacturer's instructions (Roche, Sigma) after 24 h paclitaxel treatment. The IC<sub>50</sub> was determined with Prism4 software (GraphPad software). Each value represents the mean ± s.e.m. of at least four independent experiments.

### Immunoblotting

Total cell lysates and MT fractions were prepared as previously described<sup>2</sup>. Constant protein amounts (10 µg) were loaded onto gels for total cell lysate analysis, while constant α-tubulin amounts were used for MT fraction analysis. Blots were probed with selected primary antibodies against: α-tubulin (clone DM1-A, Sigma), SEPT2 (Atlas, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France), SEPT9 (Proteintech, Manchester, United Kingdom), EB1 (H70, Santa Cruz Biotechnology, Clinisciences, Nanterre, France), CLIP-170 (H300, Santa Cruz Biotechnology), MCAK (Abnova, VWR, Fontenay sous bois, France), GFP (Cell Signaling, Ozyme), V5 (Invitrogen, ThermoFischer).

The anti-long chain-polyglutamylated-tubulin (polyE) antibody was prepared and characterized by Drs C. Janke (Institut Curie, Orsay, France) and T. Surrey (London Research Institute, London, England). Protein bands were visualized with respective HRP-conjugated secondary antibodies and the ECL detection kit (Pierce, Thermo-Fischer). Western-blot quantification was performed after film digitization using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD; [imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).

### Immunofluorescence and microscopy

Cells grown on glass coverslips were immunostained with primary  $\alpha$ -tubulin (clone DM1-A, Sigma), SEPT2 (Atlas), GFP (Cell Signaling) or V5 (Invitrogen) antibodies, after fixation with 3.75% paraformaldehyde/PBS, permeabilization with 0.1% Triton X-100/PBS and blocking with 0.5% BSA/PBS. Secondary antibodies were Alexa Fluor 488- or 555-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgGs (Molecular Probes, Invitrogen) and Cyanine 5 antibody against mouse IgGs (Abcam, Paris, France). Actin microfilaments were visualized by fluorescent phalloidin (Sigma).

Images were acquired using either a Zeiss LSM 510 confocal microscope (63  $\times$  1.4 NA objective) or a Leica DMLB microscope (40 or 100  $\times$  1.3 NA objective). In the latter case, image acquisitions were performed using a Scion CFW1312M CCD camera driven from an Apple Macintosh G4 computer and homemade software. Data were quantified using the ImageJ software.

### Statistical analysis

Quantitative data are the means  $\pm$  s.e.m. of at least four independent experiments. Paclitaxel cytotoxicity measurements were compared using multiple covariance analysis on StatView 5 software (SAS institute). The following symbols were used: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ .

### Acknowledgements

We thank V. Nicolas (Platform MIPSIT, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Châtenay-Malabry, France) for valuable help in cell imaging. The authors are grateful to Pr W. Trimble, Drs C. Janke and A. Gassama for sharing materials. This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Comité des Hauts de Seine de the Ligue contre le Cancer and by grants to B.T., L.K., and J.S. from the Ministère de la Recherche.

### Author details

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 1193, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France. <sup>2</sup>INSERM UMR-S 968, CNRS UMR 7210, Univ. Pierre et Marie Curie Paris 06, Sorbonne Universités, Paris, France. <sup>3</sup>APHP, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, hôpital Antoine Bécclère, Clamart, France

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Supplementary Information** accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1318-6>).

Received: 6 September 2018 Revised: 14 December 2018 Accepted: 18 December 2018

Published online: 22 January 2019

### References

- Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D. & Papadimitriou, C. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 890–903 (2012).
- Froidevaux-Klipfel, L. et al. Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Paclitaxel-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics* **11**, 3877–3886 (2011).
- Froidevaux-Klipfel, L. et al. Septin cooperation with tubulin polyglutamylation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget* **6**, 36063–36080 (2015).
- Fung, K. Y. Y., Dai, L. & Trimble, W. S. Cell and molecular biology of septins. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **310**, 289–339 (2014).
- Montagna, C., Bejerano-Sagie, M. & Zechmeister, J. R. Mammalian septins in health and disease. *Res. Rep. Biochem.* **5**, 59–72 (2015).
- Peterson, E. A. & Petty, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin. Genet.* **77**, 511–524 (2010).
- Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. & Mitchison, T. J. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell* **3**, 791–802 (2002).
- Sellin, M. E., Sandblad, L., Stenmark, S. & Gullberg, M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3152–3164 (2011).
- Kalikin, L. M., Sims, H. L. & Petty, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* **63**, 165–172 (2000).
- Scott, M., McCluggage, W. G., Hillan, K. J., Hall, P. A. & Russell, S. E. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int. J. Cancer* **118**, 1325–1329 (2006).
- Stanbery, L. et al. High SEPT9\_v1 expression is associated with poor clinical outcomes in head and neck squamous cell carcinoma. *Transl. Oncol.* **3**, 239–245 (2010).
- Gonzalez, M. E. et al. High SEPT9\_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. *Cancer Res.* **67**, 8554–8564 (2007).
- Connolly, D. et al. Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* **13**, R76 (2011).
- Chacko, A. D. et al. Expression of the SEPT9\_i4 isoform confers resistance to microtubule-interacting drugs. *Cell. Oncol.* **35**, 85–93 (2012).
- Bertin, A. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J. Mol. Biol.* **404**, 711–731 (2010).
- Kinoshita, M. et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* **11**, 1535–1547 (1997).
- Silverman-Gavrila, R. V. & Silverman-Gavrila, L. B. Septins: new microtubule interacting partners. *Sci. World J.* **8**, 611–620 (2008).
- Spiliotis, E. T. Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. *Cytoskeleton* **67**, 339–345 (2010).
- Wloga, D. & Gaertig, J. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* **123**, 3447–3455 (2010).
- Hallak, M. E., Rodriguez, J. A., Barra, H. S. & Caputto, R. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* **73**, 147–150 (1977).
- Aillaud, C. et al. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* **358**, 1448–1453 (2017).
- Ersfeld, K. et al. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* **120**, 725–732 (1993).



23. Banerjee, A. Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 598–601 (2002).
24. Bonnet, C. et al. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylolation. *J. Biol. Chem.* **276**, 12839–12848 (2001).
25. Lacroix, B. et al. Tubulin polyglutamylolation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell. Biol.* **189**, 945–954 (2010).
26. Magiera, M. M. & Janke, C. Posttranslational modifications of tubulin. *Curr. Biol.* **24**, R351–R354 (2014).
27. Song, Y. & Brady, S. T. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* **25**, 125–136 (2015).
28. McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. & McCann, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 96–132 (2008).
29. Peris, L. et al. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* **174**, 839–849 (2006).
30. Peris, L. et al. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* **185**, 1159–1166 (2009).
31. Bai, X. et al. Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J. Cell Biol.* **203**, 895–905 (2013).
32. Sellin, M. E., Stenmark, S. & Gullberg, M. Cell type-specific expression of SEPT3-homology subgroup members controls the subunit number of heteromeric septin complexes. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1594–1607 (2014).
33. Smith, C. et al. Septin 9 exhibits polymorphic binding to F-actin and inhibits myosin and cofilin activity. *J. Mol. Biol.* **427**, 3273–3284 (2015).
34. Janke, C., Rogowski, K. & van Dijk, J. Polyglutamylolation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* **9**, 636–641 (2008).
35. Rogowski, K. et al. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **143**, 564–578 (2010).
36. Berezniuk, I. et al. Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin. *J. Biol. Chem.* **287**, 6503–6517 (2012).
37. Sangrajang, S. et al. Association of estramustine resistance in human prostatic carcinoma cells with modified patterns of tubulin expression. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 325–331 (1998).
38. Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 183–194 (2012).
39. Bridges, A. A. & Gladfelter, A. S. Septin form and function at the cell cortex. *J. Biol. Chem.* **290**, 17173–17180 (2015).
40. Oegema, K., Savoian, M. S., Mitchison, T. J. & Field, C. M. Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **150**, 539–552 (2000).
41. Joo, E., Surka, M. C. & Trimble, W. S. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev. Cell* **13**, 677–690 (2007).
42. Surka, M. C., Tsang, C. W. & Trimble, W. S. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3532–3545 (2002).
43. Nagata, K. et al. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.* **278**, 18538–18543 (2003).
44. Poüs, C., Klipfel, L. & Baillet, A. Cancer-related functions and subcellular localizations of septins. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 126–133 (2016).
45. Spiliotis, E. T. Spatial effects - site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases. *J. Cell Sci.* **131**, 207555–207564 (2018).
46. Chacko, A. D. et al. SEPT9\_v4 expression induces morphological change, increased motility and disturbed polarity. *J. Pathol.* **206**, 458–465 (2005).
47. Dolat, L. et al. Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *J. Cell Biol.* **207**, 225–235 (2014).
48. Kremer, B. E., Adang, L. A. & Macara, I. G. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell* **130**, 837–850 (2007).
49. Spiliotis, E. T. & Gladfelter, A. S. Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic* **13**, 195–203 (2012).
50. Spiliotis, E. T., Hunt, S. J., Hu, Q., Kinoshita, M. & Nelson, W. J. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* **180**, 295–303 (2008).
51. Kremer, B. E., Haystead, T. & Macara, I. G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4648–4659 (2005).
52. Beise, N. & Trimble, W. Septins at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 4141–4146 (2011).
53. Liu, M., Shen, S., Chen, F., Yu, W. & Yu, L. Linking the septin expression with carcinogenesis. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 3601–3608 (2010).
54. Stanbery, L. & Petty, E. M. Steps solidifying a role for SEPT9 in breast cancer suggest that greater strides are needed. *Breast Cancer Res.* **14**, 101–103 (2012).
55. Verdier-Pinard, P. et al. Septin9\_i2 is downregulated in tumors, impairs cancer cell migration and alters subnuclear actin filaments. *Sci. Rep.* **7**, 44976–44993 (2017).
56. Amir, S., Golan, M. & Mabeesh, N. J. Targeted knockdown of SEPT9\_v1 inhibits tumor growth and angiogenesis of human prostate cancer cells concomitant with disruption of hypoxia-inducible factor-1 pathway. *Mol. Cancer Res.* **8**, 643–652 (2010).
57. Gilad, R. et al. High SEPT9\_i1 Protein expression is associated with high-grade prostate cancers. *PLoS ONE* **10**, e0124251 (2015).
58. Amir, S. & Mabeesh, N. J. SEPT9\_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule disrupting agents. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 1926–1931 (2007).
59. Golan, M. & Mabeesh, N. J. SEPT9\_i1 is required for the association between HIF-1 $\alpha$  and importin- $\alpha$  to promote efficient nuclear translocation. *Cell Cycle* **12**, 2297–2308 (2013).
60. Tazat, K., Schindler, S., Deppeing, R. & Mabeesh, N. J. Septin 9 isoform 1 (SEPT9\_i1) specifically interacts with importin- $\alpha$ 1 to drive hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  nuclear translocation. *Cytoskeleton* <https://doi.org/10.1002/cm.21450> (2018).
61. Gonzalez, M. E., Makarova, O., Peterson, E. A., Privette, L. M. & Petty, E. M. Up-regulation of SEPT9\_v1 stabilizes c-Jun-N-terminal kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells. *Cell Signal.* **21**, 477–487 (2009).
62. Daire, V. et al. Kinesin-1 regulates microtubule dynamics via a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **284**, 31992–32001 (2009).
63. Nakos, K., Rosenberg, M. & Spiliotis, E. T. Regulation of microtubule plus end dynamics by septin 9. *Cytoskeleton*. <https://doi.org/10.1002/cm.21488> (2018).
64. Mavrakis, M. et al. Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat. Cell Biol.* **16**, 322–334 (2014).
65. Farrugia, A. J. & Calvo, F. The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 1709–1716 (2016).
66. Bai, X., Karasmanis, E. P. & Spiliotis, E. T. Septin 9 interacts with kinesin KIF17 and interferes with the mechanism of NMDA receptor cargo binding and transport. *Mol. Biol. Cell* **27**, 897–906 (2016).
67. Nölke, T. et al. Septins guide microtubule protrusions induced by actin-depolymerizing toxins like *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 7870–7875 (2016).

## Présentation du deuxième volet du travail

Le travail de (Targa et al., 2019) a montré que pour induire une forte relocalisation des filaments de septines de l'actine vers les MTs, un événement qui a lieu en parallèle à l'acquisition d'une résistance au paclitaxel dans différentes lignées sensibles à la drogue, il faut surexprimer une septine de chaque groupe constituant l'octamère (telles SEPT2, SEPT6, SEPT7 et impérativement SEPT9\_i1) et que la surexpression des enzymes responsables de la polyglutamylolation des MTs (TTLL5 et TTLL11) ne servait qu'à accentuer ces processus de relocalisation et d'acquisition de la résistance. De façon intéressante, il avait été remarqué que des lignées telles RPE-1 ou HHL16 qui expriment un fort niveau basal de SEPT9\_i1, relocalisaient rapidement leurs filaments de septines de l'actine vers les MTs lorsqu'elles sont exposées à un traitement aigu par du paclitaxel à une concentration qui correspond à environ 3 fois l'IC<sub>50</sub> de la drogue. Ces cellules résistent au traitement sans surexpression de septines, ni d'accentuation de la polyglutamylolation des MTs, indiquant que des déterminants cellulaires et moléculaires affectant la localisation subcellulaire des filaments de septines, autres que ceux identifiés lors d'une exposition au long cours (Froidevaux-Klipfel et al., 2015 ; Targa et al., 2019), existent. L'identification de ces déterminants moléculaires a fait l'objet de la deuxième partie de ma thèse. J'ai profité de cet effet du paclitaxel pour explorer les mécanismes contrôlant la localisation subcellulaire des septines, et ai mis en évidence le rôle crucial que jouent l'activité de Cdc42 et sa protéine effectrice BORG2 (une protéine liant les septines à l'actine en interphase) dans cette régulation. J'ai montré que, lors d'un traitement par du paclitaxel, la forme active de Cdc42 (GTP-Cdc42), identifiée pour la première fois au niveau des fibres de stress, diminuait, résultant en une dégradation par le protéasome de sa protéine effectrice BORG2. La diminution du niveau de cet effecteur induit le détachement rapide des septines des fibres de stress, et leur relocalisation sur le cytosquelette de MTs. De façon remarquable, la perte de BORG2, en causant une relocalisation rapide des septines, résulte également en l'acquisition d'une résistance au paclitaxel. Ce travail, qui a été soumis à *Current Biology* et est actuellement en cours de révision, met en lumière la plasticité étonnante de localisation des septines, ainsi que la rapidité qu'ont les cellules à remodeler leur cytosquelette en réponse à un stimulus ou stress particulier.

## **Cdc42 and its effector BORG2 control the subcellular localization of septin filaments between actin stress fibers and microtubules**

Joëlle Salameh<sup>1</sup>, Isabelle Cantaloube<sup>1</sup>, Béatrice Benoit<sup>1</sup>, Christian Poüs<sup>1,2\*</sup>, Anita Baillet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 1193, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie-Hormonologie, Hôpital Antoine Bécclère, AP-HP, Clamart, France.

\* Correspondence to:

Christian Poüs [christian.pous@universite-paris-saclay.fr](mailto:christian.pous@universite-paris-saclay.fr); ORCID: 0000-0002-2502-7854

or to Anita Baillet [anita.baillet@universite-paris-saclay.fr](mailto:anita.baillet@universite-paris-saclay.fr); ORCID: 0000-0003-1784-8254

### **RUNNING TITLE**

BORG2-dependent cellular localization of septins

### **KEYWORDS**

Septin, BORG2, Cdc42EP3, Cdc42, Actin, Microtubule, Paclitaxel, Chemoresistance

### **SUMMARY**

Cell resistance to taxanes involves several complementary mechanisms among which septin filament relocalization from actin stress fibers to microtubules plays an early role. By investigating the molecular mechanism underlying this relocalization, we found that acute paclitaxel treatment triggers proteasome-mediated degradation of BORG2/Cdc42EP3, a Cdc42 effector that links septins to actin in interphase cells. BORG2 silencing not only caused septin detachment from stress fibers but also mimicked the effects of paclitaxel by triggering both septin filament relocalization to microtubules and a significant drug resistance. Conversely, BORG2 overexpression retained septins on actin fibers even after paclitaxel treatment, without affecting paclitaxel sensitivity. Upstream of BORG2, we found that paclitaxel-mediated inhibition of Cdc42 resulted in a drop in BORG2 level and in the relocalization of septins to microtubules. Accordingly, while septins relocalized when overexpressing an inactive mutant of Cdc42, the expression of a constitutively active mutant acted locally at actin stress fibers to prevent septin release from the fibers, even after paclitaxel treatment. These findings reveal the roles of Cdc42 and BORG2 in controlling the interplay between septin filaments, actin fibers and microtubules in basal condition and in response to taxanes.

## **INTRODUCTION**

Septins are a family of GTP-binding proteins, which were first discovered in budding yeast mutants defective in cytokinesis and are evolutionarily conserved from yeast to mammals. In humans, there are 13 septins clustered into four subgroups (2, 3, 6 and 7) based on sequence homology<sup>1,2</sup>. They assemble into hetero-hexamers or into hetero-octamers when they include a septin from group 3 like SEPT9<sup>3,4,5,6</sup>. These oligomers can directly associate with membranes of specific curvature<sup>7</sup>. At the plasma membrane, they multimerize into filaments<sup>8</sup>, so that they are now considered to be the fourth element of the cytoskeleton<sup>9</sup>. Septins are implicated in a growing array of cellular functions both in mitosis and in interphase, acting either as scaffolds or diffusion barriers<sup>9,10,11,12,13</sup>. In basal conditions, septin filaments bind preferentially to actin stress fibers<sup>14,15</sup> resulting in their strengthening<sup>16</sup>. Septins are also found to associate partly with microtubules (MTs) in a few cell types<sup>[17],[18]</sup>. Many isoforms of septins have been described, especially for SEPT9 whose isoform 1 (SEPT9\_i1) recently emerged as an important player in tumorigenesis and chemoresistance<sup>19,20,21,22</sup>. Depending on their tissue-specific expression patterns or on their subcellular location, septin filaments play different roles in controlling protein turnover or their organization at membranes, both in physiology and in pathology<sup>10,11,12,13,23</sup>. In mitotic cells, septins form highly organized rings at division sites and understanding the reorganization of septin filaments from an hourglass to a double ring during cytokinesis in budding yeast is still the focus of many studies<sup>24,25,26</sup>. Cytokinesis failure due to septin misregulation or mislocalization induces cellular abnormalities frequently recovered in cancer cells<sup>27</sup>. In interphase cells, perturbation of the subcellular location of septins was also shown to contribute to cancer or to resistance to MT-targeted poisons<sup>13</sup>. It is therefore important to explore in depth the mechanisms that control their subcellular compartmentalization. Strikingly, long-term or acute cell adaptations to cancer chemotherapy with drugs of the taxane family like paclitaxel or docetaxel<sup>28</sup> trigger in various cell lines<sup>19</sup> a spectacular but yet underexplored phenotype in which septin filaments that were initially coaligned with actin stress fibers switch to a coalignment with MTs. Such change contributes to early cell adaptation to the drug<sup>19,29</sup> and highlights the importance of the relationships between these three cytoskeleton elements.

BORGs (Binders Of Rho GTPases)/Cdc42EPs (Cdc42 Effector Proteins) are a family of 5 downstream effectors of the small GTPase Cdc42<sup>30</sup>. All BORGs bind to septins and reinforce septin filament bundling<sup>31</sup>. BORG functions remain underexplored in pathophysiology, with the exceptions of BORG2/Cdc42EP3 (the only BORG carrying an actin binding domain) and BORG3/Cdc42EP5, which both contribute to tumor progression through the bundling and stabilization of actin contractile fibers<sup>16,32</sup>. Cdc42, whose activation is spatially and temporally regulated<sup>33</sup>, is pivotal in activating signaling cascades that regulate cell adhesion, cell shape changes, cytoskeletal dynamics, proliferation,

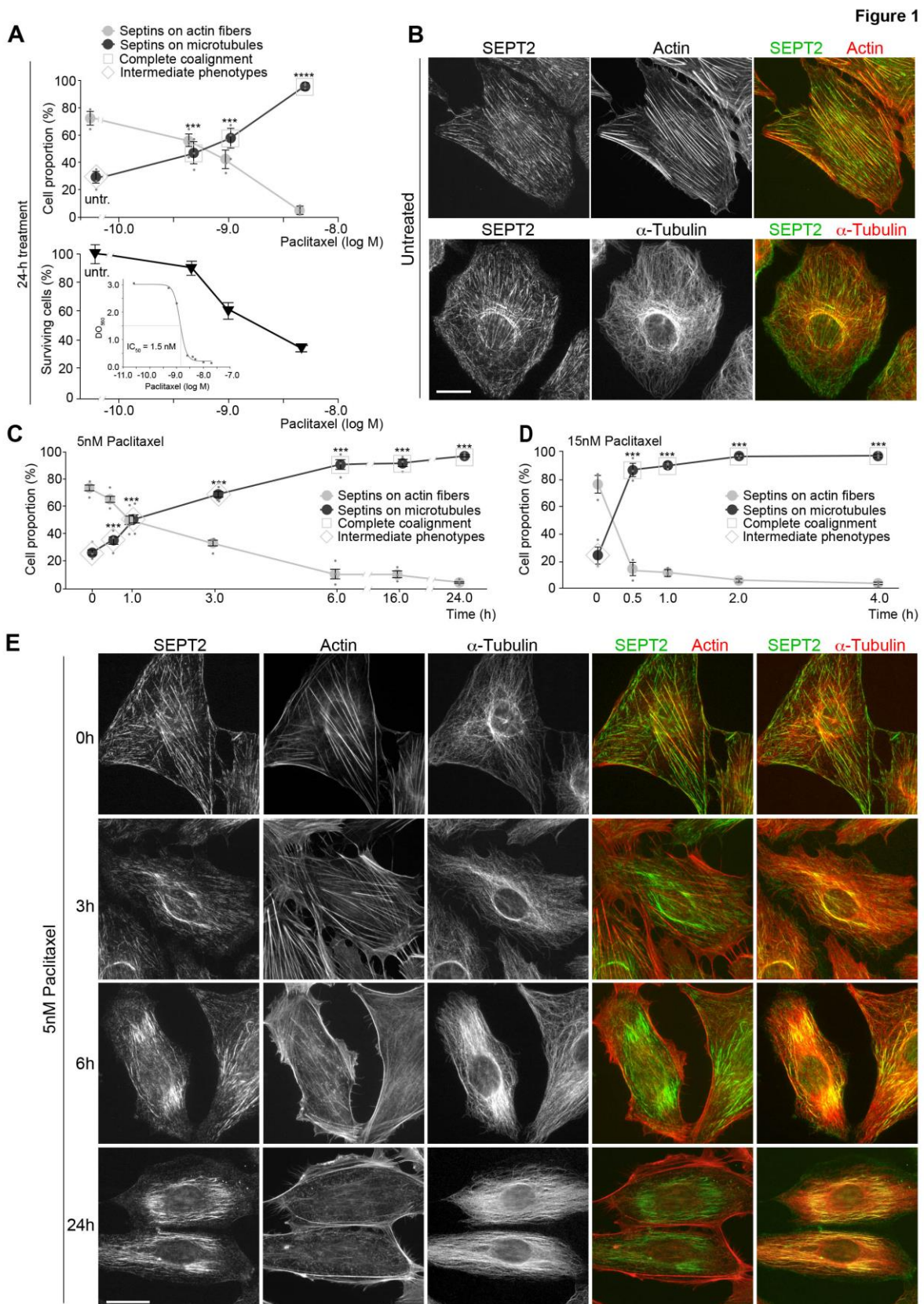
migration or polarity, and therefore is crucial in cancer malignancy (for review in breast, see <sup>34</sup>). Cdc42 activation is mainly expected to occur at the plasma membrane to locally control actin cytoskeleton remodeling in various situations<sup>35</sup>. Until now, the studies that aimed to decipher the relationships between Cdc42, BORGs and septins did not provide a consistent picture. In interphase mammalian cells, active Cdc42 inhibits BORG binding to septins, but the subcellular location of such process has not been investigated<sup>31</sup>. Conversely, in *S. cerevisiae*, the recruitment of septins involving the Gic proteins (BORG homologs) to the future bud site at the plasma membrane is under the control of Cdc42, but in a nucleotide state that is still controversial<sup>36,37,38,39</sup>.

Here, taking advantage of the effects of paclitaxel treatment to explore the mechanisms that allow the switch from septin filament coalignment with actin stress fibers to a coalignment with MTs, we demonstrate that the initial event that causes this relocalization is a decrease of active Cdc42 that leads to a proteasome-mediated degradation of BORG2, ultimately preventing septin filament attachment to actin stress fibers and allowing their subsequent association with MTs. Therefore, BORG2 level appears as a key factor in regulating the interplay between three cytoskeletal elements. Moreover, we found that BORG2 loss resulted in fast cell adaptation to taxanes, revealing a new feature of this protein function that should be taken into account in therapeutic strategies.

## **RESULTS and DISCUSSION**

### **Septin filaments relocalize from actin stress fibers to microtubules in a dose- and time-dependent manner after acute paclitaxel treatment**

To evaluate how early a phenotype of septin coalignment with MTs could occur upon paclitaxel treatment, we first quantified its effectiveness and kinetics in response to various paclitaxel concentrations. In interphase untreated HHL16 cells, we measured that  $72 \pm 4\%$  of the cells (**Fig. 1A**, top graph) displayed septin filaments that strictly coaligned with actin fibers (**Fig. 1B**, top), while the rest of the cell population ( $28 \pm 4\%$ ) exhibited septin filaments that distributed both on stress fibers and along MTs (in various proportions) and were therefore classified as displaying an intermediate MT coalignment phenotype (**Fig. 1A** top graph and **Fig. 1B**, bottom). After 24-h exposure to various paclitaxel concentrations, we observed that cells presenting septins on MTs no longer displayed an intermediate phenotype but complete septin co-alignment with MTs (**Fig. 1A**, top graph). The proportion of such cells increased as a function of the drug concentration as it doubled to reach  $57 \pm 7\%$  at 1nM paclitaxel (-9.0 on the log scale) as compared to untreated cells ( $28 \pm 4\%$ ) and extended to  $95 \pm 2\%$  at 5nM (-8.3 on the log scale) (**Fig. 1A**, top graph). In HHL16 cells, 5nM roughly corresponds to three times the paclitaxel  $IC_{50}$ , and results in 35% survival after 24-h treatment (**Fig. 1A**, bottom graph). At this stage, we could not determine if these surviving cells at 24h were the ones already displaying some of their septins along MTs in basal conditions (the 28% that were measured in **Fig. 1A** top graph, without paclitaxel) or were cells that actually relocalized their septins from actin stress fibers to MTs upon paclitaxel treatment. Exploring the kinetics of cell response to 5nM paclitaxel revealed that septin coalignment with MTs is a rapid event as  $51 \pm 6\%$  of the cells displayed an intermediate phenotype as soon as 1h after drug exposure (**Fig. 1C**). Intermediate stages could be observed up to 3h with some residual SEPT2 signal along actin fibers (**Fig. 1E**). At 5nM, starting from 6-h paclitaxel treatment, almost 90% of the cells exhibited a complete coalignment with MTs that was paralleled by a strong reduction of the stress fibers (**Fig. 1E**, bottom row). Increasing paclitaxel concentration further accelerated septin coalignment with MTs, as a 30-min exposure to 15nM (**Fig. 1D**) gave similar results as those observed with 5nM paclitaxel after 6h (**Fig. 1C**). As 100% of the cells survived such a brief paclitaxel treatment (30 min, 15nM; data not shown), we conclude that paclitaxel actually triggered dose- and time-dependent septin relocalization to MTs. The higher the paclitaxel concentration is, the quicker the relocalization occurs. Such a fast remodeling of cytoskeleton elements suggests that it happens through the immediate effects of modulating a signaling pathway rather than through a longer adaptive process involving a regulation of gene expression and de novo protein expression.



**Fig. 1 Septin filaments present majorly on actin stress fibers progressively relocate to microtubules upon paclitaxel treatment in a dose- and time-dependent manner**

(A) Effect of 24-h paclitaxel treatments (0, 0.5, 1 or 5nM expressed as log(M)) on septin localization (Top graph; n=3, 350 cells analyzed per condition) and on HHL16 survival as determined by an MTT



assay (Bottom graph; n=3). The square boxes denote the situations in which all the septins were found to coalign with MTs, while the diamond boxes indicate those in which intermediate coalignment phenotypes were observed. The inset shows the IC<sub>50</sub> measurement curve as determined after 72-h exposure to paclitaxel (n=1). **(B)** Subcellular location of septin filaments in the paclitaxel-sensitive HHL16 cell line in basal condition. Endogenous septin filaments, revealed by immuno-labeling with anti-SEPT2 antibody, completely associate to actin fibers in most cells (top row), and in a few cases partly associate to MTs as well (bottom row, intermediate phenotype). **(C-E)** Kinetics of septin relocation to MTs after exposure to 5nM paclitaxel (n=3, 250 cells analyzed per condition) **(C, E)** or 15nM paclitaxel (n=3, 280 cells analyzed per condition) **(D)**. **(E)** Septin filament relocation revealed by the labeling of endogenous SEPT2 following the indicated paclitaxel treatments. Note the progressive relocation of septins to MTs. All the values shown are the mean  $\pm$  s.e.m for the indicated number of experiments.

Statistical comparisons were made using chi-square test relative to the proportion of cells measured in the controls at t=0 or at 0nM paclitaxel. \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001. untr. = untreated. Scale bars = 10  $\mu$ m.

### **Septin filament relocation upon paclitaxel treatment is not a consequence of MT stabilization**

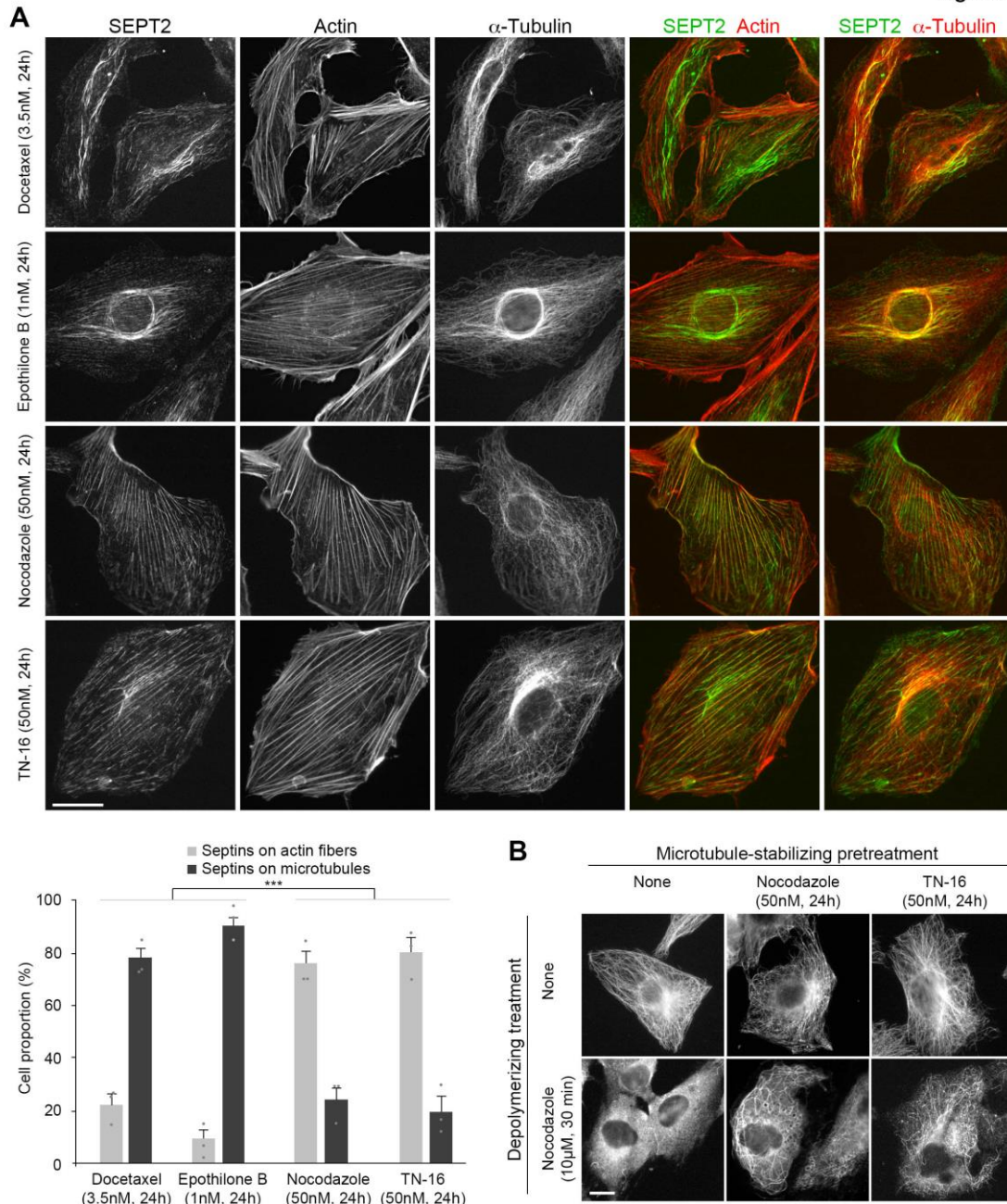
To determine whether the change in septin filament location is specific to paclitaxel treatment, we studied the effect of docetaxel and epothilone B (another MT-targeting agent with a binding site overlapping that of taxanes<sup>40</sup>). Both 3.5nM docetaxel and 1nM epothilone B (three times their respective IC<sub>50</sub>) caused complete septin filament relocation to MTs within 24 hours (**Fig. 2A**). As these drugs are all MT stabilizers, we further tested whether septin relocation was a consequence of MT stabilization. We took advantage of the property of MT destabilizers that target the colchicine site<sup>41,42</sup>, like nocodazole or TN-16, to stabilize MTs when they are used at submicromolar concentrations<sup>43,44</sup>. As expected, after such treatments (50 nM, 24h), we observed dense MT networks (**Fig. 2A**) among which several MTs resisted an additional depolymerizing treatment (10  $\mu$ M, 30 min) of nocodazole (**Fig. 2B**). In these conditions of MT stabilization, septin filaments remained on actin fibers (**Fig. 2A**). Thus, septin relocation did not arise from the stabilization of the MT network but was driven by drugs that bind to  $\beta$ -tubulin at or near the taxane site.

### **The initiation of septin recruitment to MTs following acute paclitaxel treatment neither relies on SEPT9\_i1 increase nor on MT polyglutamylation**

We previously observed that long-term paclitaxel-adapted cells exhibited increased SEPT9\_i1 expression<sup>19</sup> and that such increase could induce septin relocation to MTs in a way that was amplified by tubulin polyglutamylation<sup>29</sup>. Therefore, we first wondered whether acute paclitaxel treatment further increases SEPT9\_i1 expression in HHL16, a cell line among others that almost exclusively expresses the SEPT9\_i1 isoform in basal conditions<sup>29</sup>. Since the levels of SEPT9 and of SEPT2



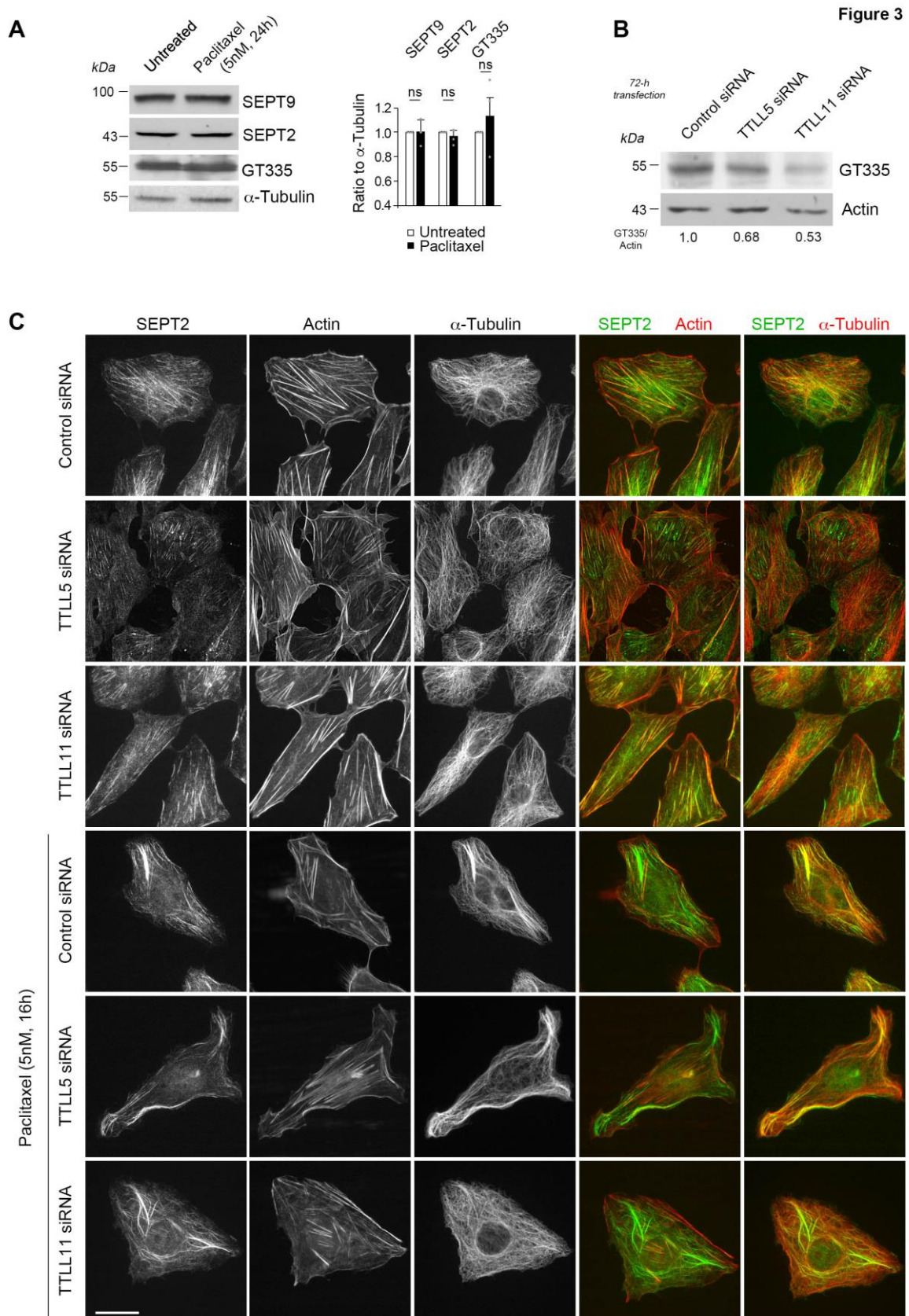
Figure 2



**Fig. 2 Subcellular relocation of septin filaments does not result from microtubule stabilization**

**(A)** Immunofluorescence images showing septin filament localization in HHL16 cells after 24-h treatments with 3.5nM docetaxel, 1nM epothilone B, or with MT-destabilizers used at stabilizing concentrations (50nM nocodazole or TN-16). The histogram shows the proportions of cells that display septins on actin or on MTs in each condition ( $n=3$ , 200 cells analyzed per condition). All the treated cells that display septin filaments along MTs exhibited a complete relocation. The grey bars indicate that, whatever the drug considered in each category (stabilizers or destabilizers), the significance of the comparison with a member of the other category was identical. **(B)** Extent of MT stabilization caused by nocodazole or TN-16 pretreatments (24h, 50nM) and cell exposure to MT-depolymerizing conditions (10 $\mu$ M nocodazole, 30min) ( $n=2$ ).

The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analyses were made using chi-square tests; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Scale bars = 10  $\mu$ m.



**Fig. 3 Septin relocalization after acute paclitaxel treatment is neither initiated by septin overexpression nor by tubulin polyglutamylation**  
**(A)** Immunoblots showing SEPT9, SEPT2 and tubulin polyglutamylation (of any length) levels upon paclitaxel treatment at a concentration known to induce septin filament relocalization to MTs.

Quantifications are presented in the histogram (n=3). **(B)** Western-blot showing the inhibition of tubulin polyglutamylation by a 72h RNAi of either TLL5 (glutamate-branching enzyme) or TLL11 (glutamate chain-elongating enzyme) (n=1). **(C)** As detected by SEPT2 immuno-labeling, the relocalization of endogenous septin filaments to MTs in HHL16 cells is not affected by the decrease of polyglutamylation upon paclitaxel treatment (n=3). The values shown for immunoblots are the mean  $\pm$  s.e.m of the band density ratios normalized relative to untreated controls for the indicated number of experiments. Statistical analyses were made using Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance; ns, not significant. Scale bars = 10  $\mu$ m.

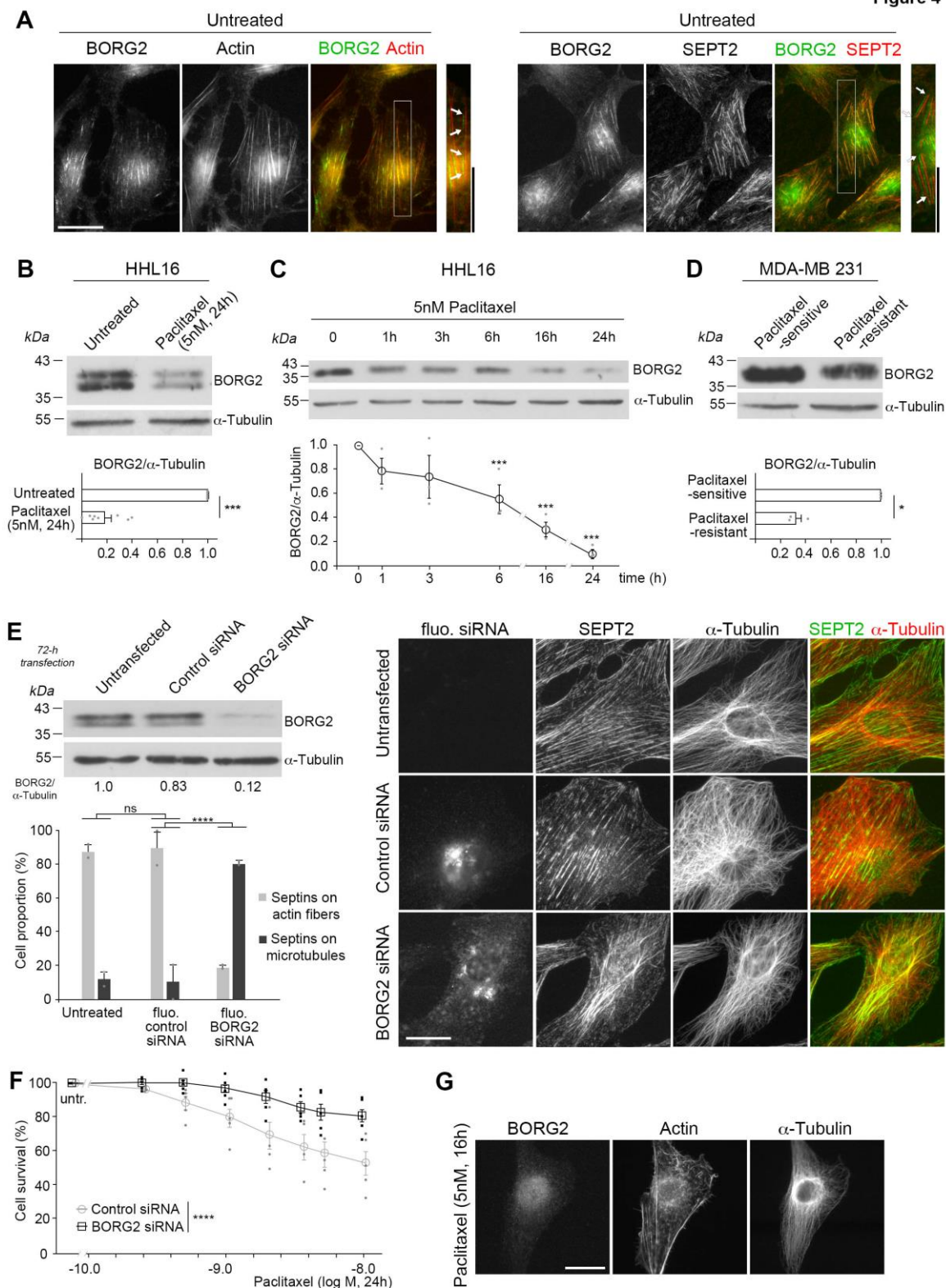
remained unchanged after a 24h-exposure to 5nM paclitaxel (**Fig. 3A**), we excluded the possibility that an increase in SEPT9\_i1 level alone could have initiated septin relocalization upon acute paclitaxel treatment. Although it was more variable, the level of tubulin polyglutamylation did not significantly change either, as observed with the GT335 antibody that recognizes glutamate sidechains branched on tubulin (**Fig. 3A**). To ascertain that polyglutamylation was not involved in the acute adaptation to paclitaxel, we inhibited it by knocking down either the initiating TLL5 enzyme (which branches the first glutamate on tubulin) or the elongating enzyme TLL11 (which elongates branched glutamate chains). As expected, both siRNA led to decreased GT335 polyglutamylation signals (**Fig. 3B**), but, in immunofluorescence experiments, none of them affected septin initial location (which still coaligned with actin fibers in untreated cells) nor their relocalization to MTs after a 5nM paclitaxel treatment for 16h (**Fig. 3C**). While long chain tubulin polyglutamylation has been shown earlier to increase septin binding to MTs<sup>19,45</sup>, we demonstrate now that it could not function as an initiating event in septin filament displacement upon acute paclitaxel treatment (**Fig. 3B-C**), even in the presence of a substantial amount of SEPT9\_i1. This indicated that other molecular effectors had to be involved.

#### **A decreased BORG2 level allows septin release from stress fibers, their subsequent relocalization to microtubules, and the onset of cell resistance to paclitaxel**

Looking into candidate proteins that could be responsible for the fast septin relocalization to MTs after acute paclitaxel treatment, we focused on BORG2. As already evidenced[16], BORG2 stretches strictly colocalized with the SEPT2-positive domains along actin stress fibers in untreated cells (**Fig. 4A**). Strikingly, a paclitaxel treatment that we found to cause effective septin relocalization (5nM, 24h) triggered substantial reduction of BORG2 level down to less than 20% of the initial amount (**Fig. 4B**), with a progressive decrease over time (**Fig. 4C**). Accordingly, BORG2 stretches could no longer be detected along stress fibers (**Fig. 4G**). BORG2 level was also reduced in long-term paclitaxel-adapted MDA-MB 231 cells<sup>19</sup>, as shown in **Fig. 4D**, suggesting that its downregulation plays a role in septin relocalization and in paclitaxel resistance. Indeed, BORG2 depletion by RNAi in HHL16 cells (**Fig. 4E**, blots) resulted in a striking septin filament relocalization from actin fibers to MTs (**Fig. 4E**, images) in



Figure 4



**Fig. 4 Septin filament relocation to microtubules is caused by a reduction of BORG2 level**  
**(A)** Immunostainings showing the endogenous BORG2 colocalization with septin filaments (right) along actin stress fibers (left) in untreated HHL16 cells, as indicated by the white arrows in zoomed areas (the red and green images have been slightly shifted on purpose; n=3). **(B-D)** Immunoblots evidencing the decrease of BORG2 levels upon acute paclitaxel treatments in HHL16 **(B, n=8 and C, n=3)** or in long-term paclitaxel adapted MDA-MB 231 cell lines **(D, n=3)**. Quantifications are presented in the bottom

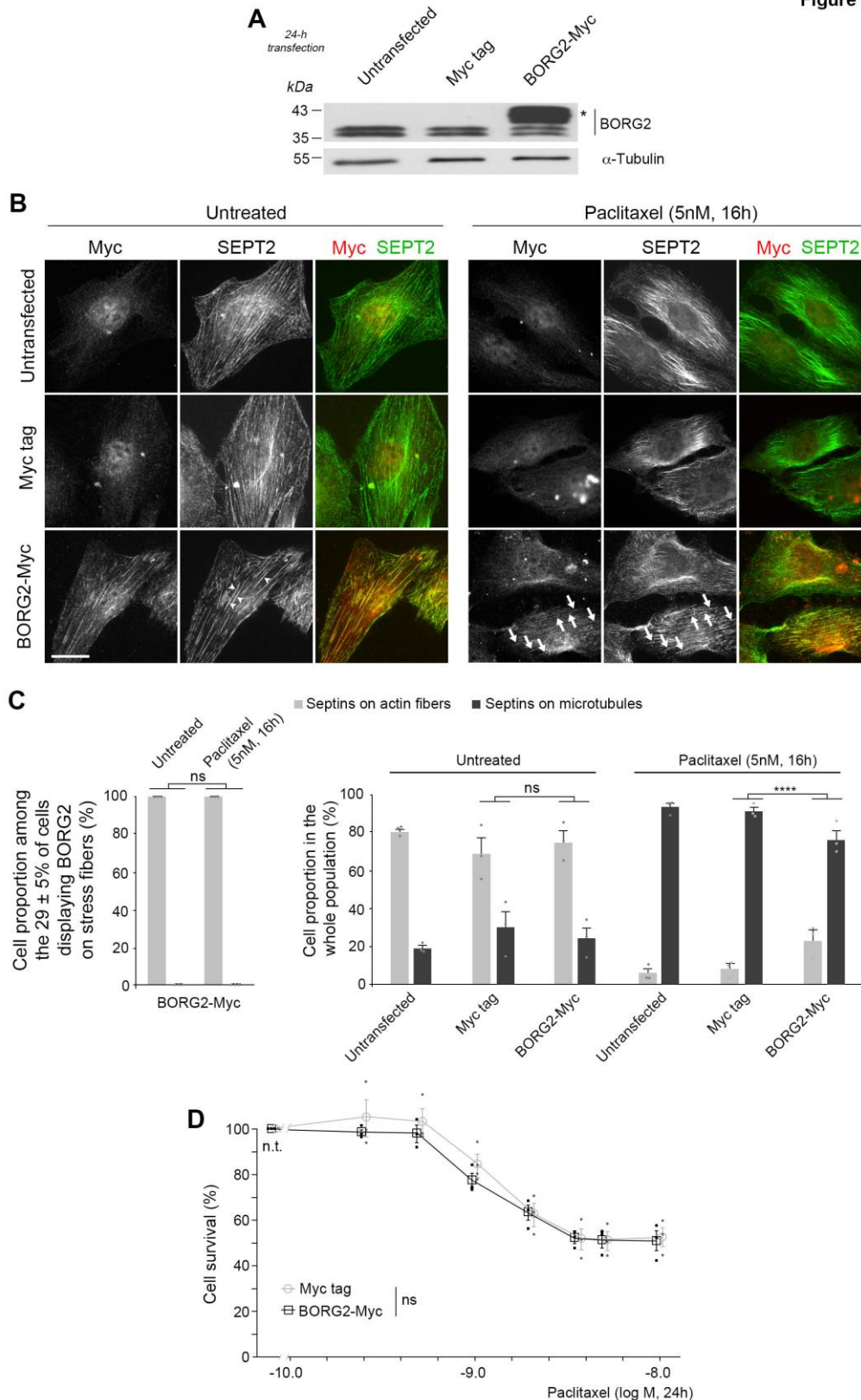
*BORG2-dependent cellular localization of septins*

graphs. **(E-F)** Effect of BORG2 RNAi on septin subcellular distribution and cell survival in HHL16 cells. **(E)** Left: Immunoblot illustrating the BORG2 depletion 72h after fluorescent siRNA transfection (n=3). Right: Immunofluorescence images showing the relocalization of septin filaments along MTs in cells depleted of BORG2. Transfected cells are detected by the signal emitted by the fluorescent siRNA. Quantifications are reported in the bottom left histogram (n=5, 2 of which were performed using fluorescent siRNA, at least 100 cells analyzed per condition). All the treated cells that display septin filaments along MTs exhibited a complete relocalization. **(F)** Cell viability MTT assay showing paclitaxel resistance at 24h after BORG2 knockdown (n=3). untr. = untreated. **(G)** Immunostaining of paclitaxel-treated (5nM, 16h) HHL16 cells illustrating the loss of endogenous BORG2 labeling from actin stress fibers (n=3).

The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of the band density ratios normalized relative to untreated controls (B-D), the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions (E-F), for the indicated number of experiments. Statistical analyses were made using Mann-Whitney U test (B and D), ANOVA (comparisons with the condition t=0) (C), chi-square tests (E), or Covariance analysis (F). ns, not significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . Scale bars = 10  $\mu$ m. The bars for zoomed areas in (A) are black.

80% of the cell population (**Fig. 4E**, histogram), without the need of any paclitaxel treatment. These data indicate that a reduction in BORG2 expression prevented septin filaments from coaligning with actin fibers, making their relocalization along MTs possible. Acute paclitaxel-mediated loss of BORG2 also resulted in thinner and less abundant actin stress fibers (**Fig. 1E**, bottom row), as already reported in cancer-associated fibroblasts with BORG2<sup>16</sup> or in melanoma cells with BORG3<sup>32</sup>. In these studies, like in ours, septin filaments that were lost from stress fibers did not reorganize into cytoplasmic rings like they do upon filamentous actin disassembly<sup>15</sup>. However, contrasting with the quick septin filament relocalization we observe, these studies report that BORG2 or BORG3 knockdown caused free septin accumulation in the cytosol<sup>16,32</sup>. In addition, while SEPT9\_i1 cooperates with BORG3 to keep septin filaments on actin stress fibers in melanoma cells<sup>32</sup>, we propose now that a high level of SEPT9\_i1 in basal conditions (like in HHL16), or that has been enhanced after a long-term adaptation to paclitaxel (MDA-MB 231<sup>19</sup>) is needed together with a reduction of BORG2 to promote septin filament association with MTs. Knowing that SEPT9\_i1 can bind both to actin<sup>46</sup> and to MTs<sup>47</sup>, this finding demonstrates that the dialog between actin fibers and septin filaments is finely tuned by BORG proteins. Remarkably, cells depleted of BORG2 were less sensitive to death triggered by 24-h treatment with paclitaxel, revealing a significant drug adaptation (**Fig. 4F**). The loss of BORG2 from stress fibers therefore represents a key event that can early contribute to the occurrence of acquired drug resistance. While the few studies that described BORG functions highlighted a role in tumoral invasion and metastases by promoting the crosslinking of actin filaments in stress fibers<sup>16,32</sup>, we now clearly evidence that a reduction in BORG2 level could also be detrimental in therapeutic approaches that use taxanes or epothilones.

Figure 5



**Fig. 5 A high level of BORG2 maintains septin filaments on actin fibers upon paclitaxel treatment**

(A) Overexpressed BORG2-Myc (indicated by a \*) can be easily distinguished from endogenous BORG2 (doublet) by a higher apparent molecular mass, as shown on the immunoblot of HHL16 cell extracts revealed by an anti-BORG2 antibody. (n=3) (B-C) BORG2 overexpression prevents paclitaxel-induced relocalization of septin filaments from actin fibers to MTs in HHL16 cells (n=3, at least 180 cells

analyzed per condition). **(B)** Cells that unambiguously overexpressed BORG2-Myc so that it coaligned with actin cables exhibited thicker septin fibers (white arrowheads) and a complete inhibition of paclitaxel-induced septin relocalization (white arrows). **(C)** Proportions of cells displaying septin filaments on actin or on MT after the indicated transfections, with or without paclitaxel treatment. Left histogram: septin distribution in cells harboring BORG2-Myc on actin stress fibers. Right histogram: septin distribution among the whole cell population. All the treated cells that display septin filaments along MTs exhibited a complete relocalization. **(D)** Cell viability MTT assays conducted on HHL16 cells expressing the control Myc-tag or the BORG2-Myc plasmids (n=3); untr. = untreated. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analyses were made using chi-square test (C) or Covariance analysis (D); ns, not significant; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . Scale bar = 10  $\mu$ m.

### **Borg2 overexpression counteracts paclitaxel-mediated septin relocalization to microtubules**

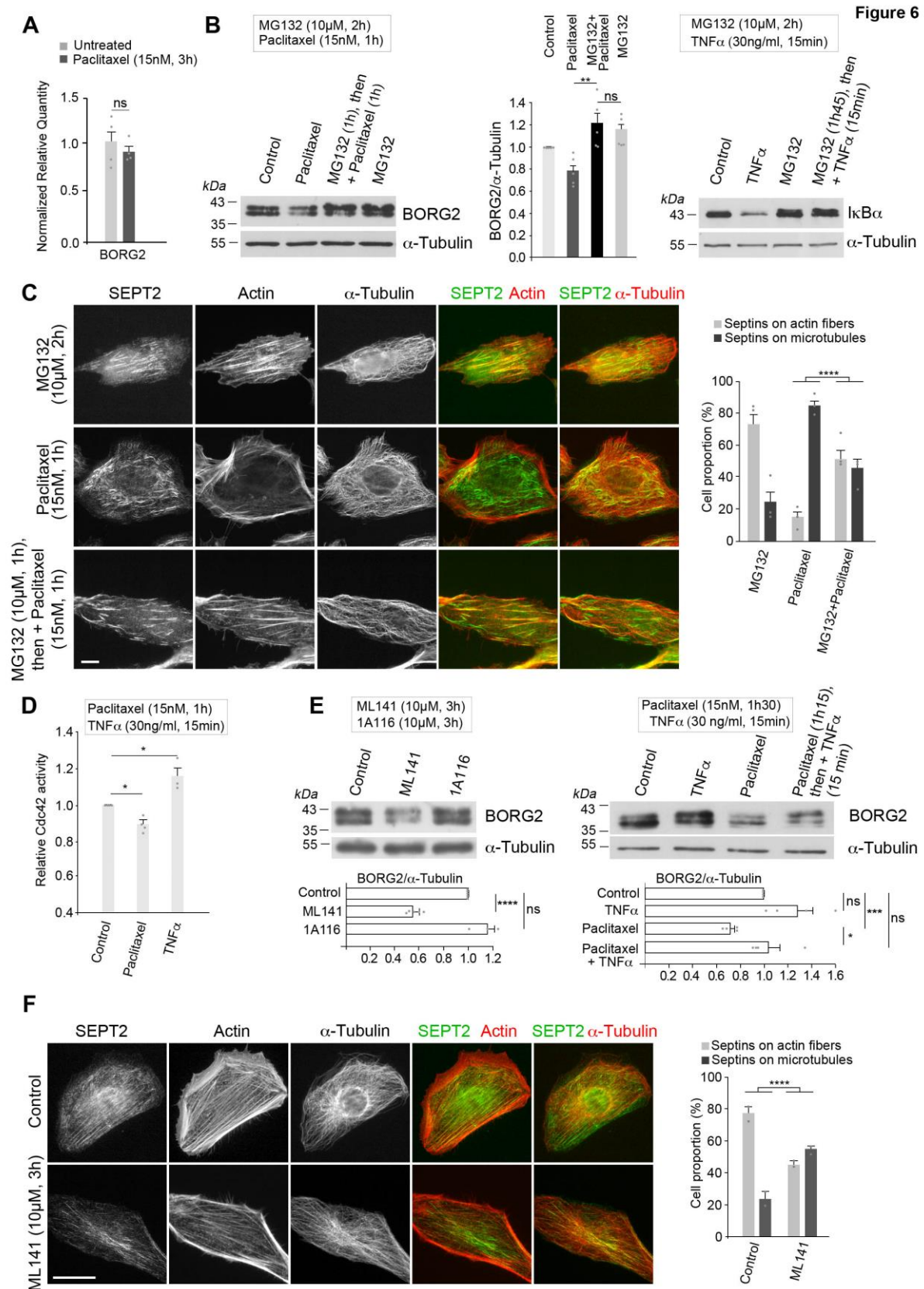
Keeping a sufficient level of BORG2 being critical to maintain septins on actin and to preserve paclitaxel sensitivity, we further tested in a reverse approach whether Myc-tagged BORG2 overexpression (**Fig. 5A**, blot with anti-BORG2 antibody) could prevent septin release from stress fibers and their subsequent relocalization to MTs. In untreated cells, overexpressed BORG2 (detected by an anti-Myc antibody) colocalized with SEPT2 in a stress fiber pattern (**Fig. 5B**, left images) like endogenous BORG2 (**Fig. 4A**) and led to the thickening of some septin fibers (**Fig. 5B**, arrowheads) as previously reported<sup>31,32</sup>. When treated with 5nM paclitaxel for 16h, both untransfected and Myc-transfected control cells massively relocalized their septins to MTs (**Fig. 5B**, right panels and **Fig. 5C**, right histogram). By contrast, in cells that displayed BORG2-Myc along stress fibers (and therefore that unambiguously expressed the transgene; i.e.  $29 \pm 5\%$  of the cells), paclitaxel failed to cause septin relocalization along MTs (**Fig. 5B**, right images and **Fig. 5C**, left histogram). The effect of BORG2 overexpression was still significant at the whole population level (**Fig. 5C**, right histogram). Therefore, BORG2 not only helps in bridging septins to actin fibers as already reported<sup>16</sup>, but importantly, keeping a sufficient level of BORG2 also prevents septin filaments from relocalizing to MTs after an acute paclitaxel treatment. Accordingly, while BORG2 depletion by RNA interference accentuated cell survival (**Fig. 4F**), BORG2 overexpression did not change cell sensitivity to paclitaxel (**Fig. 5D**). Together, our data showed that BORG2 allows septin retention on actin stress fibers, and that maintaining its expression at a sufficient level prevents septin relocalization to MTs and the subsequent emergence of a drug resistant phenotype. Therefore, BORG2 is a new actor that contributes to the early cell response to taxanes.

### **Paclitaxel-mediated drop in BORG2 level results from proteasome-mediated degradation consecutive to Cdc42 inhibition**

To characterize the process explaining the decrease in BORG2 level in response to paclitaxel, we looked into an imbalance between its synthesis and degradation. Evaluation of the BORG2 mRNA levels by

real-time quantitative RT-PCR measurements showed no difference between untreated and paclitaxel-treated cells (**Fig. 6A**). Next, to test whether enhanced protein degradation would be the reason for the drop in BORG2 level, we used the proteasome inhibitor MG132, the activity of which was verified by the prevention of TNF- $\alpha$ -mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>48</sup> (**Fig. 6B**, right panel). Pretreatment of HHL16 cells with this inhibitor prevented the decrease in BORG2 levels induced by 15nM paclitaxel treatment for 1h (**Fig. 6B**, left and central panels). As expected, preventing BORG2 degradation by MG132 substantially inhibited paclitaxel-mediated septin relocalization from actin stress fibers to MTs (**Fig. 6C**), indicating that a proteasomal-mediated degradation of BORG2 occurs upstream of septin relocalization to MTs. As BORG proteins are effectors of Cdc42<sup>49</sup>, we then assessed whether the effect of paclitaxel on BORG2 decay could be mediated by a regulation of cellular Cdc42 activity. Consistent with the observations that MT-targeting agents can decrease Rho GTPase activities<sup>50,51</sup>, we measured a reduction in the amount of GTP-bound Cdc42 (**Fig. 6D**) upon a paclitaxel treatment that caused major septin relocalization (15nM, 1h; see **Fig. 1D**), while the detection of GTP-Cdc42 was normally responsive to the known activator TNF- $\alpha$ <sup>52</sup> (**Fig. 6D**). It is possible that the effect of paclitaxel we measured on Cdc42 may have resulted from its binding to a non-tubulin target. This has been recently demonstrated with the oncoprotein GT198 whose function is inhibited upon paclitaxel treatment<sup>53</sup>, or with several mitochondrial proteins or protein complexes involved in apoptotic signaling or cellular homeostasis<sup>54</sup>. To ascertain that a reduction of Cdc42 activity would affect BORG2 level, we treated cells for 3h with ML141 or with 1A-116, which specifically inhibit Cdc42<sup>55</sup> or Rac1, respectively. Compared to vehicle (DMSO)-treated controls, only ML141 caused a major decrease in BORG2 level (**Fig. 6E**, left panel) and a dramatic removal of septins from actin stress fibers (**Fig. 6F**). This result contrasted with the previous report that Cdc42 inhibition did not affect BORG3 interaction with septins in mammalian cells<sup>31</sup>. In addition, we show that inhibiting Cdc42 with ML141 stimulated septin relocalization to MTs (**Fig. 6F**, images) in about half the cell population (**Fig. 6F**, histogram panel). Nevertheless, one could not exclude that BORG2 protein level or localization are regulated by additional signaling pathways. Indeed, Calvo et al. (2015)<sup>16</sup> evidenced that HGF, TGF $\beta$  and SDF-1 $\alpha$  increased the production of BORG2 mRNA. Also, the phosphorylation of BORG4 by PKC has been shown to switch its binding from Cdc42 to Rac and hence to reshape the actin cytoskeleton<sup>56</sup>. In a reverse approach, Cdc42 activation by acute (15-min) exposure to TNF- $\alpha$  compensated the decay of BORG2 level in paclitaxel-pretreated cells (**Fig. 6E**, right panel). Thus, the relocalization of septin filaments to MTs following paclitaxel treatment originates from a loss of active Cdc42 that in turn favors the proteasome-mediated degradation of BORG2, allowing septins to be released from actin stress fibers. Our results highlight the importance of Cdc42 activation/deactivation in controlling cellular BORG2 level and hence the subcellular localization of septin filaments, the fine-tuning of Cdc42 activity being probably a key initial event downstream of paclitaxel treatment.





**Fig. 6 Paclitaxel-induced deactivation of Cdc42 triggers a proteasome-mediated degradation of BORG2 that allows septin relocalization to microtubules**

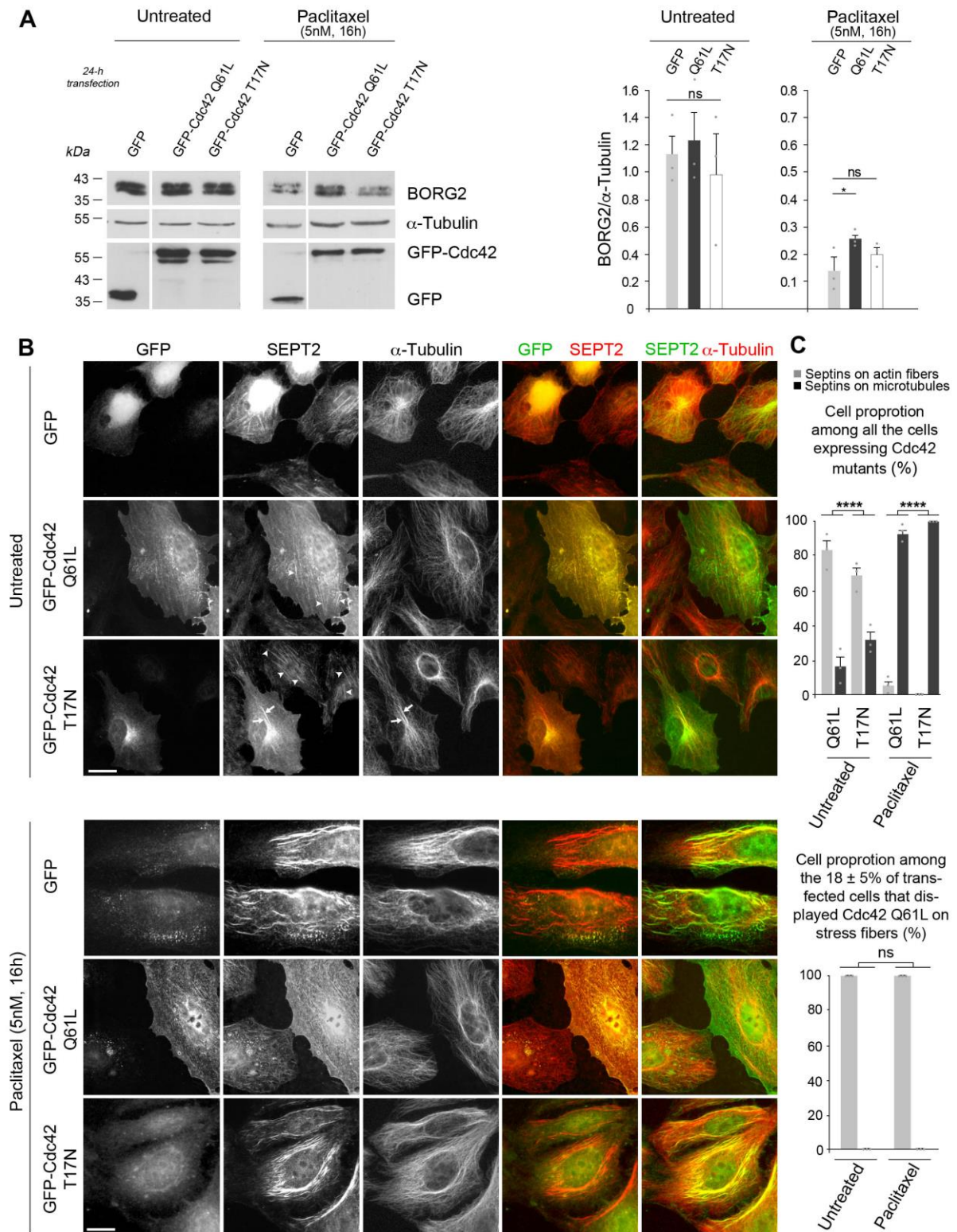
(A) Real-time quantitative RT-PCR evidencing that paclitaxel treatment did not modify the mRNA level of BORG2 in HHL16 cells (n=4). (B) Left blot: treatment of HHL16 cells with the proteasome inhibitor

MG132 (10 $\mu$ M, 2h) prevented paclitaxel (15nM, 1h)-mediated BORG2 level decrease. Western-blot quantifications are plotted in the histogram (n=5). Right blot: Control Western-blot showing the MG132-mediated prevention of I $\kappa$ B $\alpha$  degradation after TNF $\alpha$  treatment (n=3). (C) Immunofluorescence images showing the subcellular localization of septin filaments in cells pretreated or not with MG132 before paclitaxel treatment as in (B). The histogram displays the proportion of cells presenting septins along actin fibers or MTs (n=4, 200 cells analyzed per condition). (D) Decrease of active GTP-Cdc42 after paclitaxel treatment (15nM, 1h) as determined by the G-LISA<sup>®</sup> Cdc42 absorbance-based activation assay in HHL16 cells. The positive control consisted of a brief cell treatment with TNF $\alpha$  (n=4). (E) Left immunoblot: ML141 (used at 10 $\mu$ M for 3h to specifically inhibit Cdc42) but not 1A116 (a specific Rac1 inhibitor) significantly reduced the level of BORG2 (n=5 for ML141, n=3 for 1A116). Right immunoblot: Cdc42 activation by TNF $\alpha$  in paclitaxel-pretreated HHL16 cells compensates the decrease of BORG2 (n=4). (F) ML141 treatment (10 $\mu$ M, 3h) switches septin filaments from actin stress fibers to MTs in a substantial proportion of the HHL16 cell population as reported in the histogram (n=2, at least 200 cells analyzed per condition). All the treated cells that display septin filaments along MTs exhibited a complete relocalization (C, F). The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of normalized mRNA relative quantity (A), of Western-blot band density ratios normalized relative to untreated controls (B, E), of the relative GTP-bound Cdc42 amount (D), or of cell proportions (C, F), for the indicated number of experiments. Statistical analyses were made using Kruskal-Wallis non-parametric analyses of variance followed by Mann-Whitney pairwise comparisons (B, D, E), or using chi-square tests (C,F); ns, not significant; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001. Scale bars = 10  $\mu$ m.

### **Modulation of Cdc42 activity impacts the basal subcellular location of septin filaments**

The inhibition of Cdc42 triggered by ML141 treatment operates at a global cell level. To explore more finely the subcellular distributions of active and inactive forms of Cdc42 and their effects on BORG2 level and septin localization, we expressed the constitutively active Q61L or the inactive T17N Cdc42 mutants. Expressing either form of Cdc42 barely impacted the BORG2 level in untreated cells, even though Cdc42 T17N gave disparate results depending on the experiments, some of them strongly reducing the BORG2 level (**Fig. 7A**, left blot and left histogram). Upon paclitaxel treatment, a substantial decrease of BORG2 was observed that was less pronounced in the presence of the active Q61L Cdc42 compared to the GFP control or to the inactive T17N mutant (**Fig. 7A**, right blot and right histogram). Therefore, active Cdc42 partially counteracted the effect of paclitaxel, as previously observed with TNF $\alpha$  (**Fig. 6E**). In untreated cells, a sensitized detection of the GFP-tagged Q61L-Cdc42 (by indirect immunofluorescence of GFP) revealed that in a proportion of cells (18  $\pm$  5%) that expressed moderate levels of the transgene (excessive expression inducing cytoplasmic aggregates of Cdc42), the active Rho GTPase was recovered both in sub-cortical areas and on stress fibers (**Fig. 7B**, top panel, middle row). Even though active Cdc42 localization at stress fibers has never been described yet, it is in complete agreement with the localizations of BORGs and of septin filaments that we observe and that were already reported<sup>16,32</sup>. While it was more often concentrated in the vicinity of the nucleus, the inactive T17N mutant displayed a diffuse labeling without identifiable actin or MT distribution pattern (**Fig. 7B**, top panel, bottom row).

**Figure 7**



**Fig. 7 The overexpression of a constitutively active Cdc42 attenuates paclitaxel-induced BORG2 degradation while that of an inactive Cdc42 favors septin relocalization to microtubules**

(A) Immunoblots of total cell lysates of HHL16 cells overexpressing either GFP, the constitutively active (Q61L) or the inactive (T17N) forms of GFP-tagged Cdc42, with or without paclitaxel treatment (5nM, 16h). Quantifications of the BORG2-to-tubulin ratios are reported in the histogram (n=3). (B) Subcellular localization of GFP-tagged Cdc42 mutants and of septins with (bottom panel) or without

(top panel) paclitaxel treatment. The green fluorescence of the GFP tag was amplified using indirect anti-GFP immunofluorescence (n=3). (C) Quantification of B. Top histogram: quantification of the proportion of cells among the whole population that displayed septin filaments on actin or on MTs after the indicated transfections, with or without paclitaxel treatment (n=3, at least 190 cells analyzed per condition). Bottom histogram: septin distribution in cells harboring Q61L-mutated Cdc42 on actin stress fibers. All the cells that display septin filaments along MTs exhibited a complete relocalization. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of the band density ratios normalized relative to untreated controls (A) or of cell proportions (B), for the indicated number of experiments. Statistical analyses were made using Kruskal-Wallis non-parametric analyses of variance followed by Mann-Whitney pairwise comparisons (A), or using chi-square tests (B); ns, not significant; \*, p<0.05; \*\*\*\*, p<0.0001. Scale bars = 10  $\mu$ m.

Regarding the impact on septin localization, the active Cdc42 did not alter the basal distribution of septins along stress fibers in comparison with the GFP control (**Fig. 7B**, top panel, middle row and **Fig. 7C** bottom histogram), but in keeping with our above ML141 findings, the expression of the T17N mutant caused septin dissociation from actin cables and relocalization along bundled MTs (**Fig. 7B**, top panel, bottom row) in  $32 \pm 5\%$  of the transfected cells (**Fig. 7C**, top histogram). Upon paclitaxel treatment, septin filaments relocalized extensively to MTs in cells expressing the inactive T17N Cdc42 mutant (**Fig. 7B**, bottom panel, bottom row), while they remained coaligned with actin fibers in 100% of the cells that displayed the active Q61L-Cdc42 mutant on stress fibers (**Fig. 7B**, bottom panel, middle row and **Fig. 7C**, bottom histogram). This effect was less spectacular, but yet highly significant in the global population of cells expressing the Q61L versus the T17N mutants (**Fig. 7C**, top histogram). These data indicate that the active form of Cdc42 counteracts paclitaxel-mediated septin relocalization to MTs to a great extent, just like BORG2 overexpression did (see **Fig 5B and C**). Conversely, inactive Cdc42 expression triggered septin relocalization to MTs, just like BORG2 depletion did (see **Fig. 4E**). The links between the activation/deactivation cycle of Cdc42 and septin reorganization have been studied primarily in yeast during the budding process. Bud formation at the beginning of each cycle assembles a septin ring for the completion of cytokinesis, in a way that depends on cycles of Cdc42 activation. Nevertheless, the nucleotide state of Cdc42 which triggers septin recruitment to the presumptive yeast bud site remains ambiguous. Indeed, Cdc42-GTP was proposed to build the septin ring<sup>36,37,38</sup>. Conversely, it has been proposed that the GDP-bound Cdc42, in cooperation with the BORG homolog Gic1, would be the form that actually recruits septins to the bud site<sup>39</sup>. In mammalian cells, the situation is also surprising and ambiguous in the few papers that addressed this question. While in mouse embryonic fibroblasts, constitutively active Cdc42 negatively regulated BORG3 association to septins<sup>31</sup>, the expression of either the active or inactive Cdc42 mutants both led to the loss of BORG2 and of septin filaments<sup>57</sup>. Our data allow us to propose a more coherent picture in which it is the active form of Cdc42 that contributes to keep septin filaments on actin fibers and in which a decrease in the level of GTP-Cdc42 results in septin relocalization to MTs.

Altogether, we evidenced that septin subcellular location is controlled by the nucleotide state of Cdc42. Active Cdc42 that is partly located at actin stress fibers contributes to keep a sufficient level of BORG2 that is central to maintain septin filaments at stress fibers. When Cdc42 is inactivated, the subsequent proteasomal degradation of BORG2 induces septin release from stress fibers, and their consecutive relocation to MTs. Our findings underline the central roles played by Cdc42 and BORG2 in controlling the relationships between these three cytoskeletal elements. They also highlight the striking flexibility of septin filament localization and reveal how cells can quickly reshape their cytoskeletal filaments to adapt their function and responses to specific stimuli or stresses. Importantly, while a role of BORG2 recently emerged in promoting tumoral invasion and metastases, we now clearly evidence that a reduction in BORG2 level could also be detrimental in therapeutic approaches that use taxanes or epothilones by initiating drug resistance.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Cell culture and treatments:*

Experiments were performed with HHL16 (human non-cancerous immortalized hepatocytes: kind gift of Pr A. Lemoine, AP-HP Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France) or MDA-MB 231 (human metastatic breast cancer: ATCC HTB-26) cells. Both cell types were cultured with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco™ DMEM, Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Dutscher, Type of serum: 500105RR, Batch N°S15642S1810), 1% antibiotic-antifungal mixture (Gibco), and 1 (HHL16) or 2% (MDA-MB 231) L-Glutamine (Sigma, Darmstadt, Germany). The paclitaxel-resistant (Tr) and sensitive (Ts) sublimes of MDA-MB 231 were continuously cultured without (Ts) or with 25nM paclitaxel (Tr), as previously described<sup>19</sup>.

When needed, cells were treated with different concentrations (0.5 to 15nM) of paclitaxel (Sigma) for various durations, ranging from 30min to 24h, always in combinaison with 5µg/ml verapamil to inhibit efflux pumps<sup>58</sup>. HHL16 cells were also treated for 24h with either 3.5nM docetaxel, 1nM Epothilone B, 50nM TN-16 or 50nM nocodazole, all purchased from Sigma. Nanomolar concentrations of nocodazole and TN16 were proven to stabilize MTs by evaluating the density of the MT network after cell exposure to depolymerizing concentrations of nocodazole (10µM).

To block the proteasome, 10µM MG132 (Sigma) was always added to the culture medium at least 1h prior to any other treatment and further maintained on cells for a total duration of 2h. The inhibition of TNFα-mediated degradation of IκBα was used as a positive control to test the MG132 efficacy in our cells. To inactivate either Cdc42 or Rac1, cells were exposed for 3h to 10µM ML141 (Millipore) or 1A-116 (Sigma), respectively. To activate Cdc42, cells were exposed to 30ng/ml TNFα for 15min with or without pretreatment with paclitaxel. Stock solutions (10mM) of all these compounds being prepared in DMSO (Euromedex), our control conditions were performed with the corresponding volume of DMSO.

### *Cell transfections:*

Twenty-four hours prior to analysis, the recombinant plasmids were integrated into HHL16 host cells using TurboFect® reagent (ThermoFischer, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected in a 6 or 12-well plate with respectively 0.5 or 0.25µg/ml of either the dominant negative (pcDNA3-EGFP-Cdc42 T17N) or constitutively active (pcDNA3-EGFP-Cdc42 Q61L) EGFP-Cdc42 plasmids. These plasmids were kind gifts from Dr. Klaus Hahn (University of North Carolina, USA; Addgene plasmids, respectively #12601 and #12600<sup>59</sup>). Accordingly, depending on the well surface, the BORG2-Myc plasmid (pCMV6-Cdc42EP3-Myc, Ref RC201069, Origene) was used at 1 or 0.5µg/ml. The empty pcDNA3-EGFP or pCMV-Myc plasmids, at the corresponding concentrations,



were used as negative controls.

Short interfering RNA (siRNA) at 100nM were transfected 72h prior to analysis using HiPerFect® reagent according to the manufacturer's instructions. TTLL5 (Mission®siRNA, *SASI\_Hs01\_00168438*, forward: GAAACUGUCUCGUCCCUCU, reverse: AGAGGGACGAGACAGUUUC), TTLL11 (Mission®siRNA, *SASI\_Hs01\_00141865*, forward: CAUCUACUGGCAUGGAGUU, reverse: AACUCCAUGCCAGUAGAUG) and fluorescein-tagged BORG2 (forward: [6FAM]-GCUCUCAUGUUGCCCUJAU, reverse: AUAAGGGCAACAUGAGAGC) siRNAs as well as the fluorescent nonsilencer (Mission®siRNA, [6FAM]-SIC 007) used as a negative control in BORG2 silencing experiments, were all purchased from Sigma. The nonsilencer siRNA (D-001810-10-50) used in the TTLL silencing experiments was from Dharmacon.

#### *Immunoblotting:*

Cell lysates were prepared by directly scraping cells in lysis buffer and further treated as described in Froidevaux-Klipfel et al. (2011)<sup>60</sup>, before constant protein amounts were loaded onto gels for analysis. Blots were probed with selected primary antibodies directed against:  $\alpha$ -Tubulin (clone DM1A, Sigma), Actin (Ref sc-47778, Santa Cruz), SEPT9 (Ref 10769-1-AP, Proteintech), SEPT2 (Ref HPA018481, Sigma), polyglutamylated tubulin (clone GT335, Adipogen), BORG2 (Ref GTX115445, Genetex), I $\kappa$ B $\alpha$  (Ref sc-371, Santa Cruz), GFP (Ref ab290, Abcam), and Myc (clone 9E10, Sigma). Protein bands were visualized with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (anti-mouse-HRP- Ref 7076 and anti-rabbit HRP - Ref 7074, Cell signaling) and the ECL detection kit (Pierce, ThermoFischer). Quantifications of scanned Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) were performed with ImageJ, and Microsoft Excel software was used for plotting.

#### *Immunofluorescence and microscopy:*

Cells grown on glass coverslips were stained using Phalloidin-TRITC (Ref P1951, Sigma), or immunolabeled using primary anti- $\alpha$ -Tubulin (F2C, a kind gift of Dr Franck Perez Institut Curie, Paris<sup>61</sup>) or the same anti-SEPT2, anti-BORG2, anti-Myc or anti-GFP antibodies as described above, after fixation with 3.75% paraformaldehyde/PBS and permeabilization with 0.1% Triton X-100/PBS. Secondary antibodies were Alexa Fluor 488- or 555-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgGs (Molecular Probes), Fab antibodies against rabbit IgGs (Molecular Probes) and Cyanine 5 antibody against human IgGs (Jackson Immuno Research). Actin microfilaments were visualized by fluorescent phalloidin (Sigma). In all stainings, the GFP or Myc tag, when present, were always labeled first. Images were acquired using a Leica DMLB microscope (40 or 100  $\times$  1.3 NA objective). Image acquisitions were performed using a Scion CFW1312M CCD camera driven from an Apple iMac computer and homemade software. Data were quantified using the ImageJ software.

*Cell viability assay:*

Forty-eight hours or 24h after cells were transfected with siRNAs or plasmids, respectively, paclitaxel was added at increasing concentrations to the culture medium. In all cases, 24h after paclitaxel treatment, cell sensitivity to the drug was measured using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma). In order to determine the IC<sub>50</sub> for paclitaxel in HHL16 cells, an MTT assay was conducted 72h after paclitaxel treatment. The IC<sub>50</sub> was determined with Prism4 software (GraphPad software).

*Determination of the level of GTP-loaded Cdc42 protein in cell lysates:*

The relative cellular amount of GTP-Cdc42 was determined by using the G-LISA<sup>®</sup> Cdc42 absorbance-based activation colorimetric assay (Cytoskeleton, Denver, USA). Briefly, before treatments and lysis, cells were cultivated in 1% serum for 16h and in serum-free medium for additional 8h to lower the basal Cdc42 activity, according to the manufacturer's instructions. As GTP-bound Cdc42 is highly labile, cell lysis was done in less than 10min using the ice-cold supplied lysis buffer, and immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C. Cell extracts were incubated in a 96-well G-LISA<sup>®</sup> plate coated with a Cdc42-GTP binding protein that recognizes only active Cdc42. After several washing steps, the wells were probed with a specific Cdc42 antibody followed by a secondary antibody bound to HRP. Active Cdc42 was measured with a spectrophotometer at 490 nm.

*RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR analysis:*

Total RNA was isolated using Extract-ALL phenol-guanidine reagent (Eurobio, Les Ulis, France) and chloroform, then precipitated with isopropanol, and reverse transcribed with SuperScriptIII (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed with SYBR Green (Life Technologies) detection using primers specific of the *BORG2* gene (forward: TGCATCTCAGTCCAGCCAAG, reverse: AAGTGAGGGCCCAAGATCAA). Relative gene expression is the ratio of the mRNA content of target genes to those of human *GAPDH* (forward CAGCCTCAAGATCATCAGCA, reverse TGTGGTCATGAGTCCTTCCA) and *18S* (forward TGAGAAACGGCTACCACATC, reverse TTACAGGGCCTCGAAAGAGT) house-keeping genes, according to the  $\Delta\Delta C_t$  method<sup>62</sup>. Reverse and forward oligonucleotide primers, specific to the chosen candidate and housekeeping genes, were designed using Primer3 software ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

*Statistical analysis:*



Otherwise indicated, quantitative data are the means  $\pm$  s.e.m. of at least three independent experiments. Paclitaxel cytotoxicity measurements were compared using multiple covariance analysis on StatView 5 software (SAS institute). The proportions of cells that displayed septin filaments, either on actin fibers or on MTs, were evaluated by  $\chi^2$  tests. In this context, the numbers of cells taken into account for statistical comparisons were the sum of those counted in 3 independent experiments. The following symbols were used: ns, not significant; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . All the experimental points were spotted in each quantification graph. For each quantification of septin subcellular distribution (on actin fibers or on MTs), between 100 and 500 cells per condition were analyzed.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Claudine Deloménie (Trans-Prot Platform, “Institut Paris-Saclay d’Innovation Thérapeutique”, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France) for technical assistance in quantitative RT-PCR experiments. The authors are grateful to Pr Antoinette Lemoine who provided us with the HHL16 cell line and to Drs Franck Perez and Klaus Hahn for sharing antibodies and plasmids. This work was supported by the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by a grant to J.S. from the Ministère de la Recherche.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conception and design of the work were done by CP and AB. JS and IC performed most experiments. AB and IC did the RNA isolation, real-time quantitative PCR and the Cdc42 activation assay. JS, CP and AB analyzed the data with the help of BB. CP did the statistical analysis. The manuscript was written by JS, CP and AB with an essential contribution by BB.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no competing interests.

## **REFERENCES**

1. Kinoshita, M. (2003). Assembly of mammalian septins. *J. Biochem.* *134*, 491–496.
2. Peterson, E.A., and Petty, E.M. (2010). Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin. Genet.* *77*, 511–524.
3. Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühmann, D., Macara, I.G., Weyand, M., Stark, H., and Wittinghofer, A. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* *449*, 311–315.
4. Kim, M.S., Froese, C.D., Estey, M.P., and Trimble, W.S. (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* *195*, 815–826.
5. Mendonça, D.C., Macedo, J.N., Guimarães, S.L., Barroso da Silva, F.L., Cassago, A., Garratt, R.C., Portugal, R.V., and Araujo, A.P.U. (2019). A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton (Hoboken)* *76*, 457–466.
6. Soroor, F., Kim, M.S., Palander, O., Balachandran, Y., Collins, R., Benlekbir, S., Rubinstein, J., and Trimble, W.S. (2019). Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties (Cell Biology) Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/569871> [Accessed April 16, 2020].
7. Cannon, K.S., Woods, B.L., Crutchley, J.M., and Gladfelter, A.S. (2019). An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. *J. Cell Biol.* *218*, 1128–1137.
8. Bridges, A.A., Zhang, H., Mehta, S.B., Occhipinti, P., Tani, T., and Gladfelter, A.S. (2014). Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 2146–2151.
9. Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 183–194.
10. Dolat, L., Hu, Q., and Spiliotis, E.T. (2014). Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biological Chemistry* *395*, 123–141.
11. Fung, K.Y.Y., Dai, L., and Trimble, W.S. (2014). Cell and Molecular Biology of Septins. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Elsevier), pp. 289–339. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001806000074> [Accessed April 14, 2020].
12. Montagna, C., Sagie, M., and Zechmeister, J. (2015). Mammalian septins in health and disease. *RRBC*, 59.
13. Poüs, C., Klipfel, L., and Baillet, A. (2016). Cancer-Related Functions and Subcellular Localizations of Septins. *Front Cell Dev Biol* *4*, 126.
14. Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Noda, M. (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* *11*, 1535–1547.

15. Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F., and Mitchison, T.J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell* **3**, 791–802.
16. Calvo, F., Ranftl, R., Hooper, S., Farrugia, A.J., Moeendarbary, E., Bruckbauer, A., Batista, F., Charras, G., and Sahai, E. (2015). Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep* **13**, 2699–2714.
17. Nagata, K., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Shiromizu, T., Saitoh, N., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T.J., Hotani, H., *et al.* (2003). Filament Formation of MSF-A, a Mammalian Septin, in Human Mammary Epithelial Cells Depends on Interactions with Microtubules. *J. Biol. Chem.* **278**, 18538–18543.
18. Martinez, C., Corral, J., Dent, J.A., Sesma, L., Vicente, V., and Ware, J. (2006). Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. *J Thromb Haemost* **4**, 1388–1395.
19. Froidevaux-Klipfel, L., Targa, B., Cantaloube, I., Ahmed-Zaïd, H., Poüs, C., and Baillet, A. (2015). Septin cooperation with tubulin polyglutamylolation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget* **6**, 36063–36080.
20. Gilad, R., Meir, K., Stein, I., German, L., Pikarsky, E., and Mabweesh, N.J. (2015). High SEPT9\_i1 Protein Expression Is Associated with High-Grade Prostate Cancers. *PLoS ONE* **10**, e0124251.
21. Zeng, Y., Cao, Y., Liu, L., Zhao, J., Zhang, T., Xiao, L., Jia, M., Tian, Q., Yu, H., Chen, S., *et al.* (2019). SEPT9\_i1 regulates human breast cancer cell motility through cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation. *Cell Death Dis* **10**, 720.
22. Peterson, E.A., Stanbery, L., Li, C., Kocak, H., Makarova, O., and Petty, E.M. (2011). SEPT9\_i1 and genomic instability: mechanistic insights and relevance to tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 940–949.
23. Spiliotis, E.T. (2018). Spatial effects – site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases. *J Cell Sci* **131**, jcs207555.
24. Karasmanis, E.P., Hwang, D., Nakos, K., Bowen, J.R., Angelis, D., and Spiliotis, E.T. (2019). A Septin Double Ring Controls the Spatiotemporal Organization of the ESCRT Machinery in Cytokinetic Abscission. *Current Biology* **29**, 2174-2182.e7.
25. Tamborrini, D., Juanes, M.A., Ibanes, S., Rancati, G., and Piatti, S. (2018). Recruitment of the mitotic exit network to yeast centrosomes couples septin displacement to actomyosin constriction. *Nat Commun* **9**, 4308.
26. Chen, X., Wang, K., Svitkina, T., and Bi, E. (2020). Critical Roles of a RhoGEF-Anillin Module in Septin Architectural Remodeling during Cytokinesis. *Current Biology* **30**, 1477-1490.e3.
27. Cortez, B.A., Teixeira, P.R., Redick, S., Doxsey, S., and Machado-Santelli, G.M. (2016). Multipolar mitosis and aneuploidy after chrysolite treatment: a consequence of abscission failure and cytokinesis regression. *Oncotarget* **7**, 8979–8992.
28. Weaver, B.A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2677–2681.

29. Targa, B., Klipfel, L., Cantaloube, I., Salameh, J., Benoit, B., Poüs, C., and Baillet, A. (2019). Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9\_i1 and tubulin polyglutamylation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel. *Cell Death Dis* *10*, 54.
30. Joberty, G., Perlungher, R.R., and Macara, I.G. (1999). The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6585–6597.
31. Joberty, G., Perlungher, R.R., Sheffield, P.J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T., and Macara, I.G. (2001). Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell Biol.* *3*, 861–866.
32. Farrugia, A.J., Rodríguez, J., Orgaz, J.L., Lucas, M., Sanz-Moreno, V., and Calvo, F. (2020). CDC42EP5/BORG3 modulates SEPT9 to promote actomyosin function, migration, and invasion. *Journal of Cell Biology* *219*, e201912159.
33. Phuyal, S., and Farhan, H. (2019). Multifaceted Rho GTPase Signaling at the Endomembranes. *Front. Cell Dev. Biol.* *7*, 127.
34. Zhang, Y., Li, J., Lai, X.-N., Jiao, X.-Q., Xiong, J.-P., and Xiong, L.-X. (2019). Focus on Cdc42 in Breast Cancer: New Insights, Target Therapy Development and Non-Coding RNAs. *Cells* *8*, 146.
35. Croisé, P., Estay-Ahumada, C., Gasman, S., and Ory, S. (2014). Rho GTPases, phosphoinositides, and actin: a tripartite framework for efficient vesicular trafficking. *Small GTPases* *5*, e29469.
36. Gladfelter, A.S., Bose, I., Zyla, T.R., Bardes, E.S.G., and Lew, D.J. (2002). Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *Journal of Cell Biology* *156*, 315–326.
37. Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H.B., Haarer, B.K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J.R., and Bi, E. (2006). Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1110–1125.
38. Okada, S., Leda, M., Hanna, J., Savage, N.S., Bi, E., and Goryachev, A.B. (2013). Daughter Cell Identity Emerges from the Interplay of Cdc42, Septins, and Exocytosis. *Developmental Cell* *26*, 148–161.
39. Sadian, Y., Gatsogiannis, C., Patasi, C., Hofnagel, O., Goody, R.S., Farkašovský, M., and Raunser, S. (2013). The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. *eLife* *2*, e01085.
40. Kamath, K., and Jordan, M.A. (2003). Suppression of microtubule dynamics by epothilone B is associated with mitotic arrest. *Cancer Res.* *63*, 6026–6031.
41. Lee, J.C., Field, D.J., and Lee, L.L. (1980). Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* *19*, 6209–6215.
42. Arai, T. (1983). Inhibition of microtubule assembly in vitro by TN-16, a synthetic antitumor drug. *FEBS Letters* *155*, 273–276.
43. Vasquez, R.J., Howell, B., Yvon, A.M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L. (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* *8*, 973–985.

44. Rai, A., Kapoor, S., Singh, S., Chatterji, B.P., and Panda, D. (2015). Transcription factor NF- $\kappa$ B associates with microtubules and stimulates apoptosis in response to suppression of microtubule dynamics in MCF-7 cells. *Biochemical Pharmacology* *93*, 277–289.
45. Spiliotis, E.T., Hunt, S.J., Hu, Q., Kinoshita, M., and Nelson, W.J. (2008). Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* *180*, 295–303.
46. Smith, C., Dolat, L., Angelis, D., Forgacs, E., Spiliotis, E.T., and Galkin, V.E. (2015). Septin 9 Exhibits Polymorphic Binding to F-Actin and Inhibits Myosin and Cofilin Activity. *J. Mol. Biol.* *427*, 3273–3284.
47. Bai, X., Bowen, J.R., Knox, T.K., Zhou, K., Pendziwiat, M., Kuhlenbäumer, G., Sindelar, C.V., and Spiliotis, E.T. (2013). Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J. Cell Biol.* *203*, 895–905.
48. Miyamoto, S., Maki, M., Schmitt, M.J., Hatanaka, M., and Verma, I.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I kappa B alpha is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 12740–12744.
49. Joberty, G., Perlungher, R.R., and Macara, I.G. (1999). The Borgs, a New Family of Cdc42 and TC10 GTPase-Interacting Proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6585–6597.
50. Bijman, M.N.A., van Nieuw Amerongen, G.P., Laurens, N., van Hinsbergh, V.W.M., and Boven, E. (2006). Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 2348–2357.
51. Cadamuro, M., Spagnuolo, G., Sambado, L., Indraccolo, S., Nardo, G., Rosato, A., Brivio, S., Caslini, C., Stecca, T., Massani, M., *et al.* (2016). Low-Dose Paclitaxel Reduces S100A4 Nuclear Import to Inhibit Invasion and Hematogenous Metastasis of Cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* *76*, 4775–4784.
52. Puls, A., Eliopoulos, A.G., Nobes, C.D., Bridges, T., Young, L.S., and Hall, A. (1999). Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell. Sci.* *112 ( Pt 17)*, 2983–2992.
53. Yang, Z., Gurvich, V.J., Gupta, M.L., Mivechi, N.F., and Ko, L. (2019). Oncoprotein GT198 is a direct target of taxol (Pharmacology and Toxicology) Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/675579> [Accessed May 21, 2020].
54. Chavez, J.D., and Bruce, J.E. (2019). Chemical cross-linking with mass spectrometry: a tool for systems structural biology. *Current Opinion in Chemical Biology* *48*, 8–18.
55. Surviladze, Z., Waller, A., Strouse, J.J., Bologa, C., Ursu, O., Salas, V., Parkinson, J.F., Phillips, G.K., Romero, E., Wandinger-Ness, A., *et al.* (2010). A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK51965/> [Accessed August 25, 2020].
56. Zhao, X., and Rotenberg, S.A. (2014). Phosphorylation of Cdc42 effector protein-4 (CEP4) by protein kinase C promotes motility of human breast cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 25844–25854.

57. Farrugia, A.J., and Calvo, F. (2017). Cdc42 regulates Cdc42EP3 function in cancer-associated fibroblasts. *Small GTPases* **8**, 49–57.
58. McTavish, D., and Sorkin, E.M. (1989). Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. *Drugs* **38**, 19–76.
59. Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Toutchkine, A., and Hahn, K.M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* **305**, 1615–1619.
60. Froidevaux-Klipfel, L., Poirier, F., Boursier, C., Crépin, R., Poüs, C., Baudin, B., and Baillet, A. (2011). Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics* **11**, 3877–3886.
61. Nizak, C., Martin-Lluesma, S., Moutel, S., Roux, A., Kreis, T.E., Goud, B., and Perez, F. (2003). Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo. *Traffic* **4**, 739–753.
62. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408.

## Présentation du troisième volet du travail

Dans la majorité des lignées cellulaires, les septines sont associées à l'actine alors que dans une minorité de types cellulaires, les septines se répartissent entre les fibres de stress et les microtubules (MTs). Comme déjà rapporté, nous avons observé que la dépolymérisation des microfilaments d'actine dans nos deux lignées, RPE1 et HHL16, aboutit à la formation d'anneaux de septines diffusant librement dans le cytoplasme, sans être associés à aucun autre élément du cytosquelette. De façon surprenante et jamais décrite dans la littérature, même dans les lignées où les septines sont exclusivement localisées sur l'actine, la dépolymérisation des MTs, entraîne la disparition complète des filaments de septines, sans aucune formation d'anneaux. La troisième partie de ma thèse s'est attachée à explorer le rôle des MTs dans la formation de longs filaments de septines et dans leur acheminement vers leur destination finale, l'actine. Bien qu'organisée sous forme d'article, cette partie du travail comporte encore des expériences préliminaires et nécessite des expériences complémentaires avant d'envisager une publication. Néanmoins, même si l'implication, dans la localisation finale des septines sur l'actine, d'un transport kinésine-dépendant sur les MTs est suggérée, celle d'un transport dynéine-dépendant est aussi clairement observée.

## **Microtubule-based traffic is required in septin filament formation and localization along actin stress fibers**

Joëlle Salameh<sup>1</sup>, Isabelle Cantaloube<sup>1</sup>, Benjamin Targa<sup>1</sup>, Christine Say<sup>1</sup>, Béatrice Benoit<sup>1</sup>, Christian Poüs<sup>1,2</sup>, Anita Baillet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 1193, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie-Hormonologie, Hôpital Antoine Bécère, AP-HP, Clamart, France.

### **KEYWORDS**

Septins, actin, microtubule, kinesin, dynein, paclitaxel

### **INTRODUCTION**

Septins are GTPases firstly discovered in budding yeast as proteins crucial for cell division (Hartwell, 1971) and were conserved throughout evolution in nearly all eukaryotes (Nishihama et al., 2011; Auxier et al., 2019). There are 13 human septins (SEPT1-SEPT12 and SEPT14) classified into 4 groups (SEPT2, SEPT3, SEPT6 and SEPT7) based on sequence homology (Kinoshita, 2003; Peterson and Petty, 2010). Ever since their discovery, septins were known to function as complexes. They assemble into hetero-oligomers that form higher order structures such as filaments, bundles or rings (Sirajuddin et al., 2007; Kim et al., 2011; Mendonça et al., 2019; Soroor et al., 2020). They are implicated in a plethora of cellular events where they function as diffusion barriers or scaffolds (for reviews: (Mostowy and Cossart, 2012; Dolat et al., 2014; Fung et al., 2014; Montagna et al., 2015; Poüs et al., 2016). Due to their ability to form filaments, which can associate with the plasma membrane, with actin microfilaments or with microtubules (MTs), septins are now considered to be the fourth element of the cytoskeleton (Mostowy and Cossart, 2012). Depending on the cytoskeletal element they associate with, septins can fulfill different functions like regulating cortical rigidity (Tooley et al., 2009), stress fiber integrity (Calvo et al., 2015) or vesicular traffic (Spiliotis et al., 2008) and MT dynamics (Bowen et al., 2011).

Septin-membrane association is mediated by the interaction of the conserved septin polybasic domain (PB) (Zhang et al., 1999) with a variety of phosphoinositides (PIs) at different intracellular membranes: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Kouranti et al., 2006; Bertin



et al., 2010), phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (Bertin et al., 2010); phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (Dolat and Spiliotis, 2016) and phosphatidylinositol 4-monophosphate (Omrane et al., 2019), Indeed, septin filaments can assemble on plasma membrane in an in vitro reconstituted system through a mechanism called annealing (Bertin et al., 2010) and can use actin fibers as templates to form filaments (Kinoshita et al., 2002). Accordingly, septins are majorly found to be present on stress fibers (Calvo et al., 2015; Mizutani et al., 2013 ;Shankar et al., 2010) where they bind to actin via myosin II or BORG2 in interphase (Joo et al., 2007;Calvo et al., 2015) and via anillin during cytokinesis (Kinoshita et al., 1997). In some cell types, septins can also be seen on MTs (Nagata et al., 2003; Martinez et al., 2006). However, the factors implicated in this association are still not well known. The isoform 1 of SEPT9 (termed SEPT9\_i1) is peculiar since it is the only identified septin able to physically interact with both actin (Smith et al., 2015) and MTs (Sellin et al., 2012).

The cellular dynamics of septins is complex and multifaceted, and the mechanisms that allow them to be properly retained or targeted to their destination compartments have not been well explored, especially those that might involve the MT network. MTs are the main tracks used in intracellular trafficking (For reviews: (Fourriere et al., 2020; Granger et al., 2014)). They support both short and long-range movements, using their motor proteins: kinesins that mostly move centrifugally towards the MT plus ends (Kull and Endow, 2013) and the cytoplasmic dynein/dynactin complex that moves towards the minus ends (centripetal transport) (Allan, 2011). Molecular motors selectively bind to their cargos through adaptor proteins in ways that are controlled by regulators such as the Small Ras-like GTPases (Rab) ex: Rab5 binds to early endosomes, Rab7 to late endosomes and Rab35 to recycling endosomes (for review: (Klinkert and Echard, 2016)).Although septins were found to facilitate the maturing of macropinosomes into lysosomes (Dolat and Spiliotis, 2016) or contribute to the transport of vesicles from the Golgi apparatus to the plasma membrane (Spiliotis et al., 2008), the only study that explored reciprocally the effect of vesicular traffic on septin formation has been conducted on the hyphal growth of *Ustilago Maydis* (Zander et al., 2016). It showed that septin mRNAs are transported to the growth pole of hypha by the shuttling Rab5a-positive endosomes mediated by a plus end-directed MT motor of the kinesin-3 family and the minus end-directed MT motor dynein. The authors also found that endosomes are coupled to translationally active ribosomes that translate septin mRNAs. Septins form heteromeric

subunits on the endosomes that are delivered to the growth pole where they form higher order structures (Zander et al., 2016). Whether a similar mechanism is involved in mammalian cells and whether it could contribute as an intermediate stage to the final localization of septins along other cytoskeletal elements is unknown.

In this study, we show that acute paclitaxel treatment triggers a rapid and extensive relocation of septin filaments from actin to MTs in two mammalian cell lines either presenting septin filaments in basal conditions exclusively on actin (RPE-1) or on both actin and MTs (HHL16). In order to understand the reason why septin filaments end up on actin stress fibers or on MTs, we aimed to determine the role of MTs in septin filament targeting to their final cytoskeleton partner. Our preliminary results show that MTs contribute to septin filament formation and are essential for basal septin filament coalignment with actin fibers. We also present evidence that MTs contribute to septin filaments presence on actin fibers through a dynein-dependent minus end transport.

### **Results and Discussion:**

#### **The relocation of septin filaments from actin to microtubules upon acute paclitaxel treatment is a common feature to various sensitive cell lines that express SEPT9\_i1**

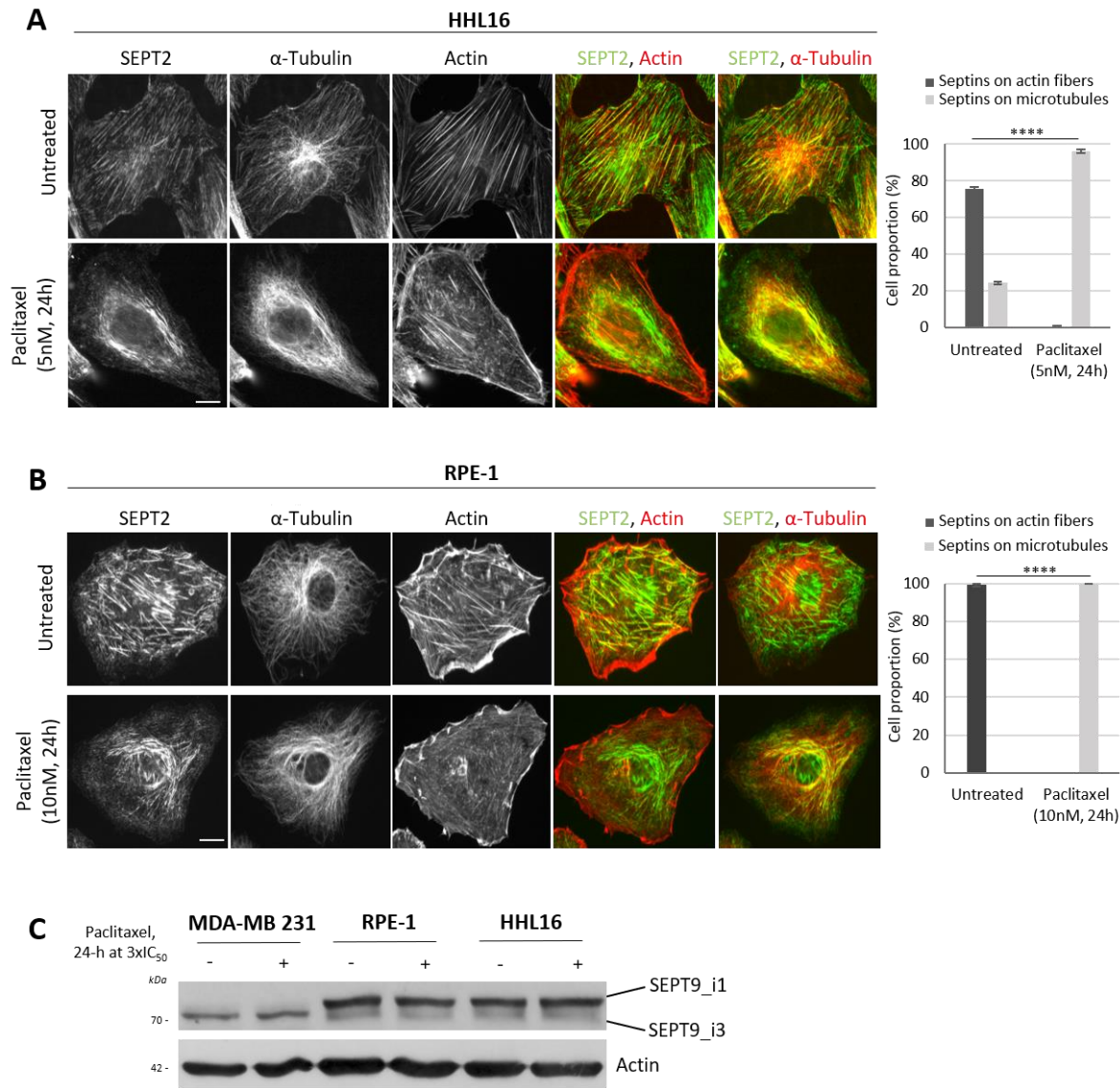
Acute paclitaxel treatment induces at about three times the IC<sub>50</sub> for 24h a complete relocation of septin filaments from actin to MTs in various immortalized or cancerous cell lines, such as in the non-human fibroblasts (CHO), non-cancerous immortalized retinal pigment epithelial 1 cells (RPE-1), immortalized hepatic cells (HHL16) and cervical cancer cells (HeLa) (Targa et al., 2019),(Salameh et al., submitted). This relocation could be observed in cells already presenting few septin filaments on MTs or not. Indeed, as an example, HHL16 cells exhibit in 74 ± 1.8% of the untreated cell population septin filaments that co-align with actin fibers, whereas 26 ± 1.8% of the cell population, present in various proportions septin filaments on MTs as well (**Fig. 1A** left panel top row, right graph -untreated-). Unlike HHL16 cells, which may present a fraction of their septin filaments on MTs in basal conditions, RPE-1 cells show septin filaments exclusively on actin fibers (**Fig.1B** left panel top row, right graph -untreated-). Septins were seen on MTs when RPE-1 cells were treated with paclitaxel at 3 times the IC<sub>50</sub> for the drug for 24h (Targa et al., 2019) leading to complete septin filament relocation to MTs (**Fig 1B** left panel bottom row, right graph -paclitaxel-). This phenotype

## Microtubule-dependent targeting of septins

could also be seen on HHL16 cells treated with 3 times the  $IC_{50}$  for paclitaxel (Targa et al., 2019; Salameh et al., submitted) (**Fig.1A** left panel bottom row, right graph -paclitaxel-).

We have previously shown the importance for cells to express high levels of the isoform 1 of SEPT9 (SEPT9\_i1) to allow septin filaments location on MTs (Froidevaux-Klipfel et al., 2015) (Targa et al., 2019). While MDA-MB 231 breast cancer cells adapted to long term paclitaxel treatment were able to relocalize their septin filaments after overexpression of SEPT9\_i1 (Froidevaux-Klipfel et al., 2015), sensitive MDA-MB 231 cells, which mostly express SEPT9\_i3 (**Fig.1C**), were unable to relocalize their septin filaments to MTs upon acute paclitaxel treatment of 25nM which correspond to 3 the  $IC_{50}$  for the drug (Targa et al., 2019) (**Fig.1C**). Accordingly, in HHL16 and RPE-1, high basal levels of SEPT9\_i1 remained unchanged after paclitaxel treatment (**Fig.1C**). Therefore, regardless of the basal septin filament location in cells rich in SEPT9\_i1, treatment with paclitaxel causes their relocalization to microtubules. For the rest of the study, we focalized on these two cell lines, HHL16 and RPE-1.

Microtubule-dependent targeting of septins

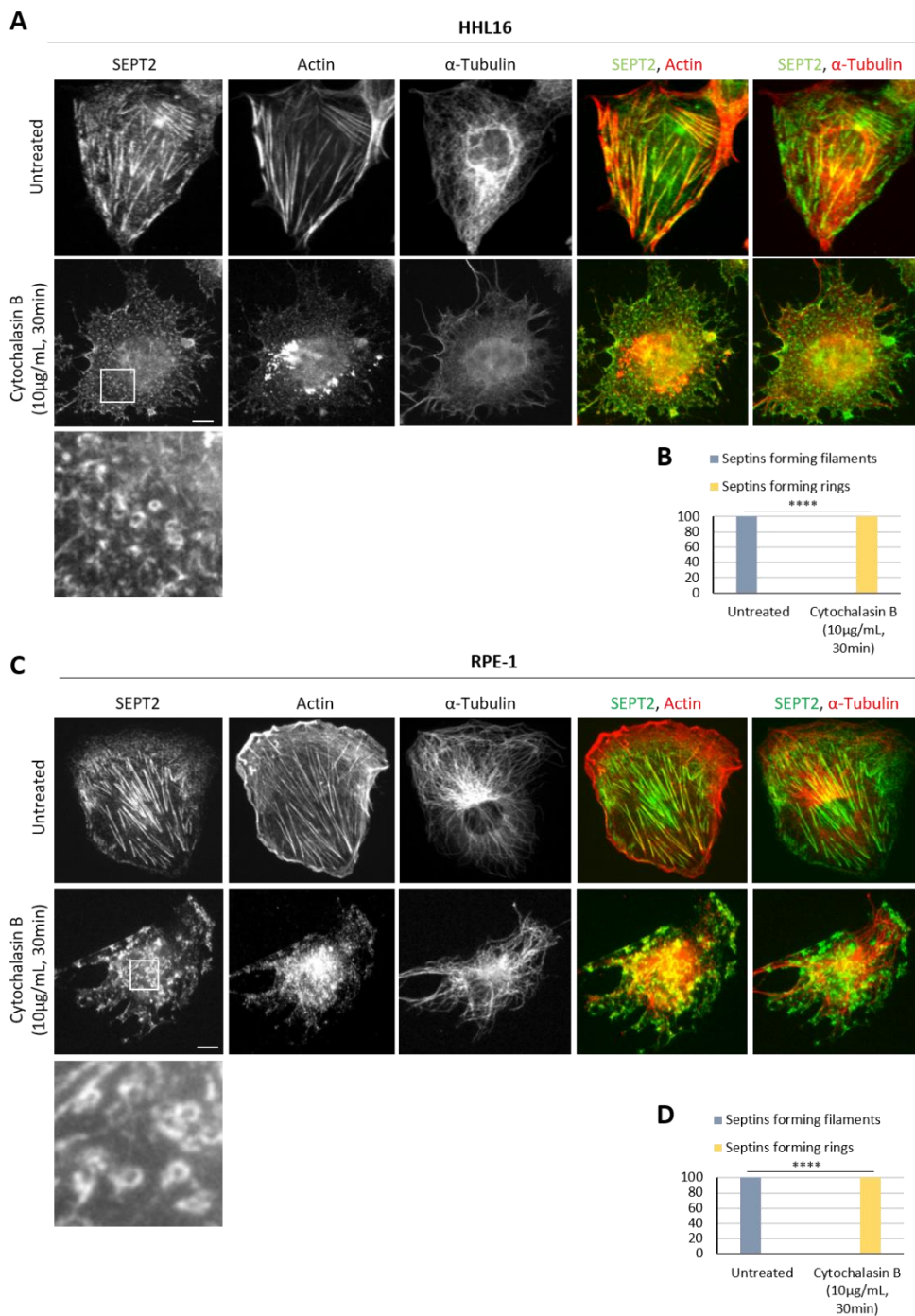


**Fig.1 Septin filaments that are associated either majorly or completely with cortical actin and stress fibers totally relocalize to microtubules after acute paclitaxel treatment in the presence of SEPT9\_i1.**

(A-B) Septin filament location in basal condition and relocalization after paclitaxel treatment revealed by the labeling of endogenous SEPT2. The histograms show the proportions of cells that display septins on actin or on MTs in each condition (n=3, 300 HHL16 cells and 250 RPE-1 cells analyzed per condition). The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analysis was made using chi-square tests; \*\*\*\*, p<0.0001. (C) Immunoblots showing SEPT9 levels with and without paclitaxel treatment in paclitaxel-sensitive MDA-MB 231, RPE-1 and HHL16 cells (n=1). Scale bars = 10  $\mu$ m.

**Microtubule depolymerization causes the loss of septin filaments co-aligning with actin**

To examine the roles of actin microfilaments and MTs in septin filament cellular localization, we performed a series of specific cytoskeleton disruption on both HHL16 and RPE-1 cell lines. Treatment of HHL16 (**Fig. 2A**) and RPE-1 (**Fig. 2C**) cells with cytochalasin B (10µg/mL, 30-min) simultaneously caused the loss of actin filaments and the formation of free septin rings in the cytoplasm (**Fig.2A and C** bottom panels,) just like previously shown by (Kinoshita et al., 2002) and (Joo et al., 2007) in 100% of the cells (**Fig.2B and D** respectively).



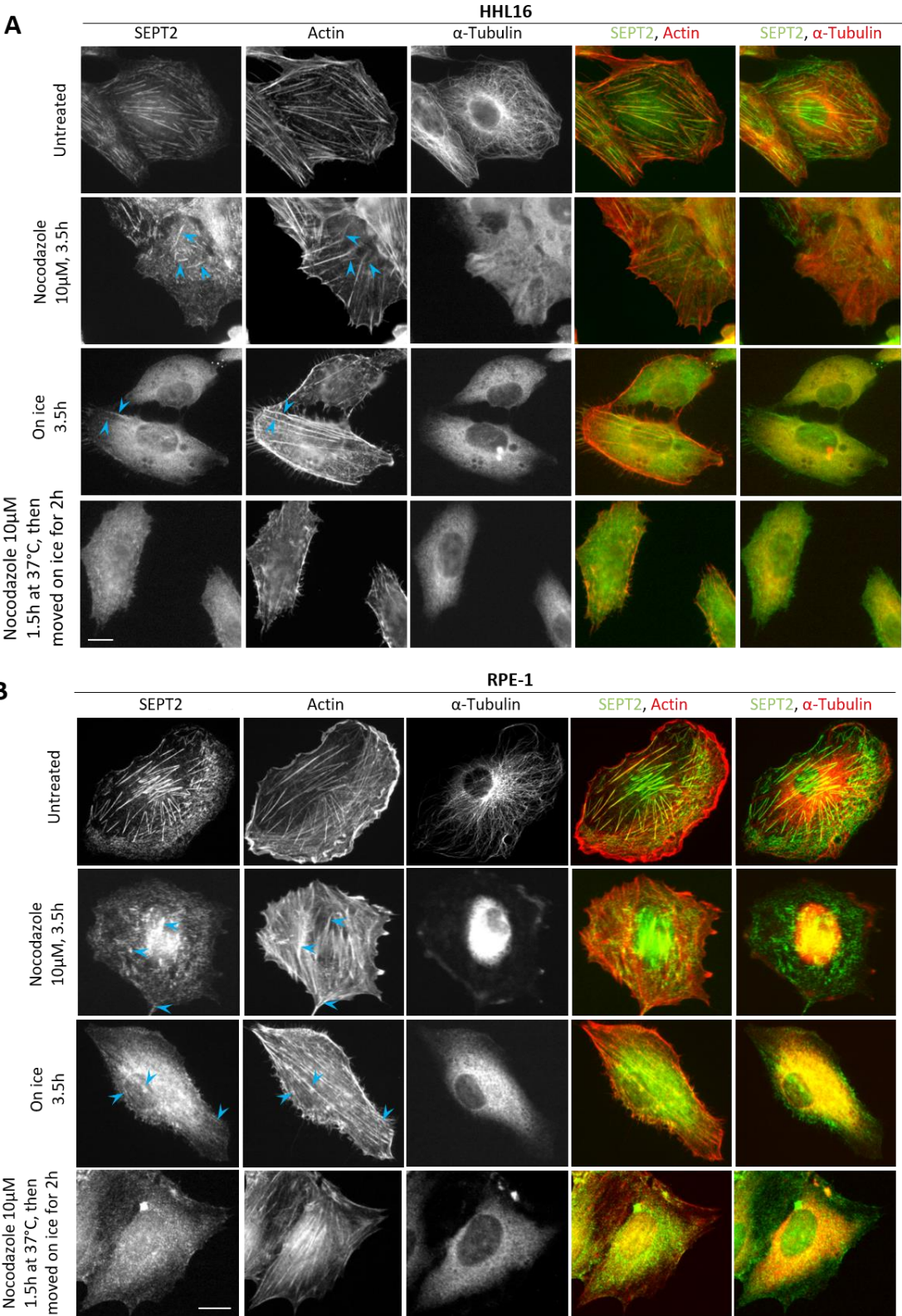
**Fig.2 Following actin depolymerization, septin filaments reorganize into cytoplasmic rings**

**(A, C)** Immunofluorescent images of endogenous SEPT2, actin and  $\alpha$ -tubulin before and after 30-min treatment with 10 $\mu$ g/mL cytochalasin B in HHL16 (n=2) and RPE-1 cells (n=2). **(B, D)** Quantification of cells presenting septins as filaments or as rings (n=2). At least 200 cells were analyzed per condition. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analysis was made using chi-square tests; \*\*\*\*, p<0.0001. Scale bars = 10  $\mu$ m.

Interestingly, MT depolymerization by nocodazole treatment (10 $\mu$ M, 3.5h) in HHL16 (**Fig. 3A**) and RPE-1 (**Fig. 3B**) cells dramatically disrupted septin filaments in both cell types, even though a few septin stretches remained attached to actin fibers (as shown with the blue arrow heads). Nocodazole depolymerizes dynamic MTs, nevertheless stable long-lived MTs resist this treatment especially those with high levels of acetylation and detyrosination (Xu et al., 2017) which could explain the incomplete phenotype i.e. the persistence of a few stretches of septins on actin. HHL16 and RPE-1 cell exposure to the cold (on ice, 3.5h) (**Fig. 3A and B**, respectively) also disrupted MTs and septin filaments to a similar or higher extent (blue arrow heads indicating the remaining septins on actin). As some MTs could also have resisted the cold (Ochoa et al., 2011), we combined both treatments starting with nocodazole alone at 37°C for 1.5h, then continuing the treatment for 2h on ice. This combination led to the loss of the vast majority of septin filaments in HHL16 and RPE-1 cells (**Fig. 3A and B** bottom panels, respectively), that were not recovered in the form of freely diffusing rings as observed following cytochalasin D treatment. A MT-templated mode of septin assembly has been suggested in cells where a subpopulation of septins that localized to MTs was lost after MT depolymerization (Surka et al., 2002; Nagata et al., 2003; Martinez et al., 2006). However, it was never previously evidenced that MT depolymerization affects actin-bound septins just like in the case of HHL16 and RPE-1 cells. These results highlight the importance of MTs in septin filament formation and attachment to actin fibers in cell lines presenting septin filaments exclusively on actin or both on actin and MTs.



Microtubule-dependent targeting of septins



**Fig.3 Microtubule depolymerization causes the loss of septin filaments, even when they are localized to actin fibers**

**(A-B)** Immunofluorescent images of endogenous SEPT2, actin and  $\alpha$ -tubulin following a MT-depolymerizing treatment induced by either nocodazole exposure (10 $\mu$ M, 3.5h, 37°C) (**A** and **B** second rows) (n=2 for HHL16 cells and n=3 for RPE-1 cells), or cold exposure (on ice, 3.5h) (**A** and **B** third rows)

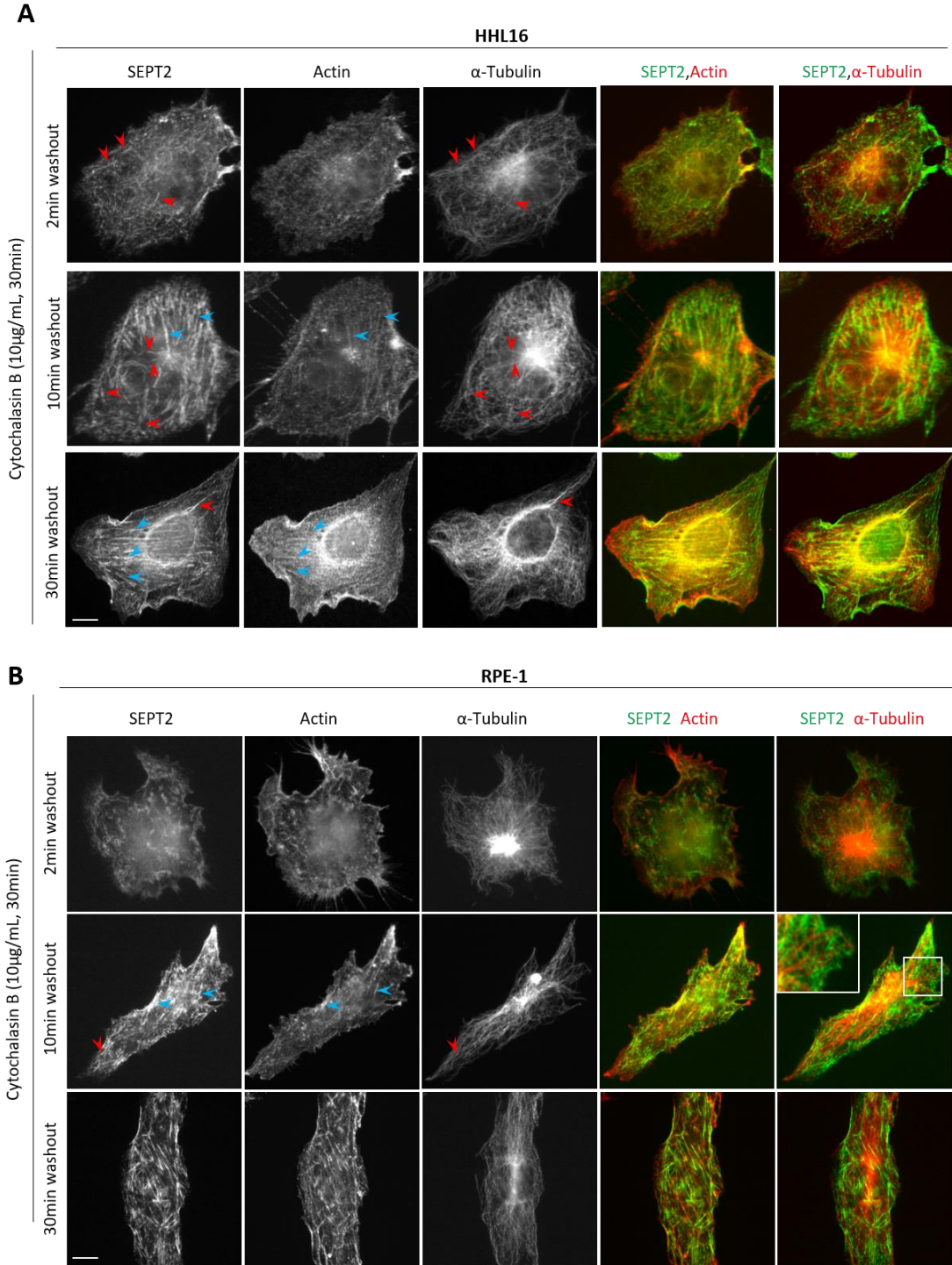
## Microtubule-dependent targeting of septins

(n=2 for HHL16 and RPE-1 cells). MTs were also depolymerized with a combined treatment, which consisted in cell exposure to 10 $\mu$ M nocodazole (1.5h, 37°C) followed by a cold treatment (on ice, 2h) while maintaining nocodazole presence (**A** and **B** bottom rows) (n=2 for HHL16 and RPE-1 cells). Note that the combined treatment was the most efficient in affecting septin filament integrity. Scale bars = 10 $\mu$ m. The blue arrow heads indicate the remaining septin stretches on actin.

### **Septin stretches forming at early stages of actin filament repolymerization partially localize to microtubules**

In order to have a better outlook on septin filament formation and subsequent localization on actin, we analyzed the aspect and location of septin stretches reforming after cytochalasin B washout. In HHL16 cells (**Fig. 4A**), stretches of septins could be observed at 2min after the start of the washout of cytochalasin B, even before the appearance of actin filaments. Many of these septin stretches locate at the MT network (**Fig.4A** top row, red arrow heads). After 10min of washout, longer septin stretches reassembled on stress fibers in parallel to the repolymerization of actin (**Fig.4A** middle row, blue arrow heads) while some of them could still be observed on MTs (**Fig.4A** middle row, red arrow heads). After 30min of washout, most of septin filaments coaligned with actin fibers. Since we are not following the repolymerization of septin filaments in the same cell at different washout time-points, we cannot determine whether the septin stretches observed on MTs after 2min of washout are those who will switch to actin later on or whether they belong to the subpopulation of septin filaments that will stay on MTs in a few HHL16 cells (**Fig.1A** right panel -untreated-). Although RPE-1 cells do not present septins on MTs unless treated with paclitaxel, they nevertheless display a few septin stretches on MTs, 10 min after cytochalasin B washout. In parallel, actin stress fiber reformation occurs with small stretches of septins appearing on them (**Fig.4B** middle row, blue arrow heads). After 30min of washout of cytochalasin B and the re-establishment of an extensive actin fiber network, septins did not only form stretches but also longer filaments which could be observed on actin fibers. These results indicate that MTs participate in septin filament formation and in their localization to actin fibers.





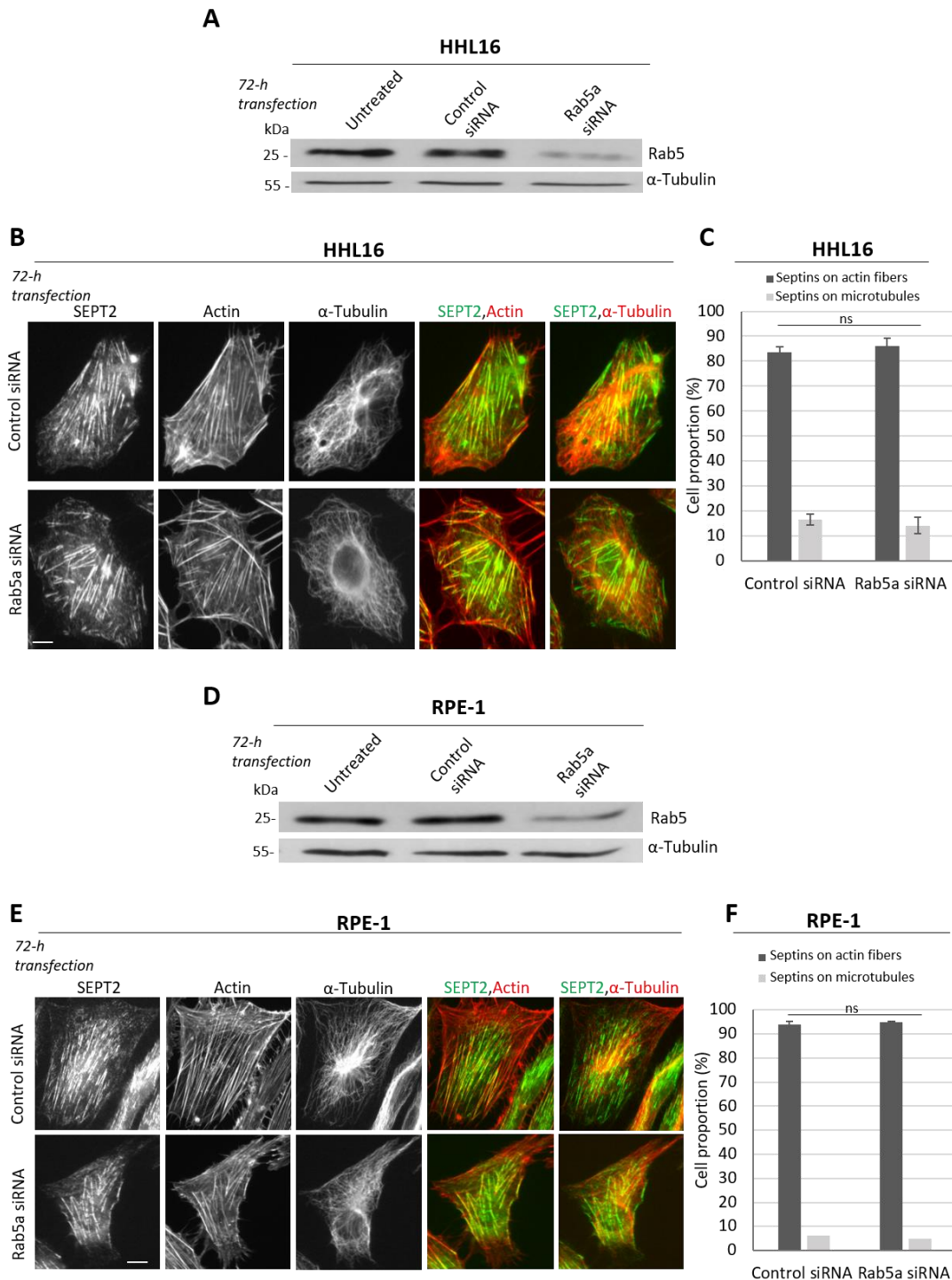
**Fig.4 Septin stretches reform in parallel to actin repolymerization and partly appear on MTs in early actin filament reforming stages**

Immunofluorescent detection of the location of endogenous SEPT2 in cytochalasin B (10 $\mu$ g/mL, 30-min) treated HHL16 (**A**) and RPE-1 cells (**B**) after 2-, 10- or 30-min washout of the depolymerizing treatment with a cytochalasin B-free medium (n=2 for both cell lines). Scale bars = 10 $\mu$ m. The blue arrowheads indicate septin stretches forming on the repolymerizing actin filaments while the red ones show septin stretches forming on MTs.

### **Septin filament location on actin stress fibers does not involve Rab5a**

Based on our above results and on the study conducted on *Ustilago Maydis*, which exhibits a MT-based transport of septin mRNAs and of septins on Rab5a-positive endosomes towards the tip of hyphae (Zander et al., 2016), we evaluated the role of endocytic membranes and of MT motors in septin filament location on actin fibers. We first evaluated the implication of Rab5 in septin filament formation and location on actin fibers. Transfection of HHL16 and RPE-1 cells with Rab5a siRNA (**Fig.5 A** and **D**, respectively) caused an important decrease in Rab5a cell level. The diminished Rab5a protein amount did not affect septin filament localization neither in HHL16, nor in RPE-1 cells (**Fig. 5B** and **E**). Indeed, the percentage of cells presenting septin filaments on MTs after Rab5a siRNA transfection remained unchanged in comparison to the control (**Fig.5C** and **F**). Although Rab5a is not implicated in septin filament formation and location, this does not completely exclude the fact that septin filaments can be transported on early endosomes since other Rab proteins could take over the role of the decreased Rab5a like Rab4 and Rab21 (For review: (Hutagalung and Novick, 2011)). Septins are also known to link Rab7 (Dolat and Spiliotis, 2016), however the knockdown of this Rab did not affect septin filament formation nor localization (data not shown). We also looked into the role of Rab35 in carrying septin filaments, since, this Rab, important in recycling, can be present on the plasma membrane in regions rich in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Kouranti et al., 2006) just like septins (Bertin et al., 2010), but our one siRNA experiment had no effect on septin localization (data not shown).

## Microtubule-dependent targeting of septins



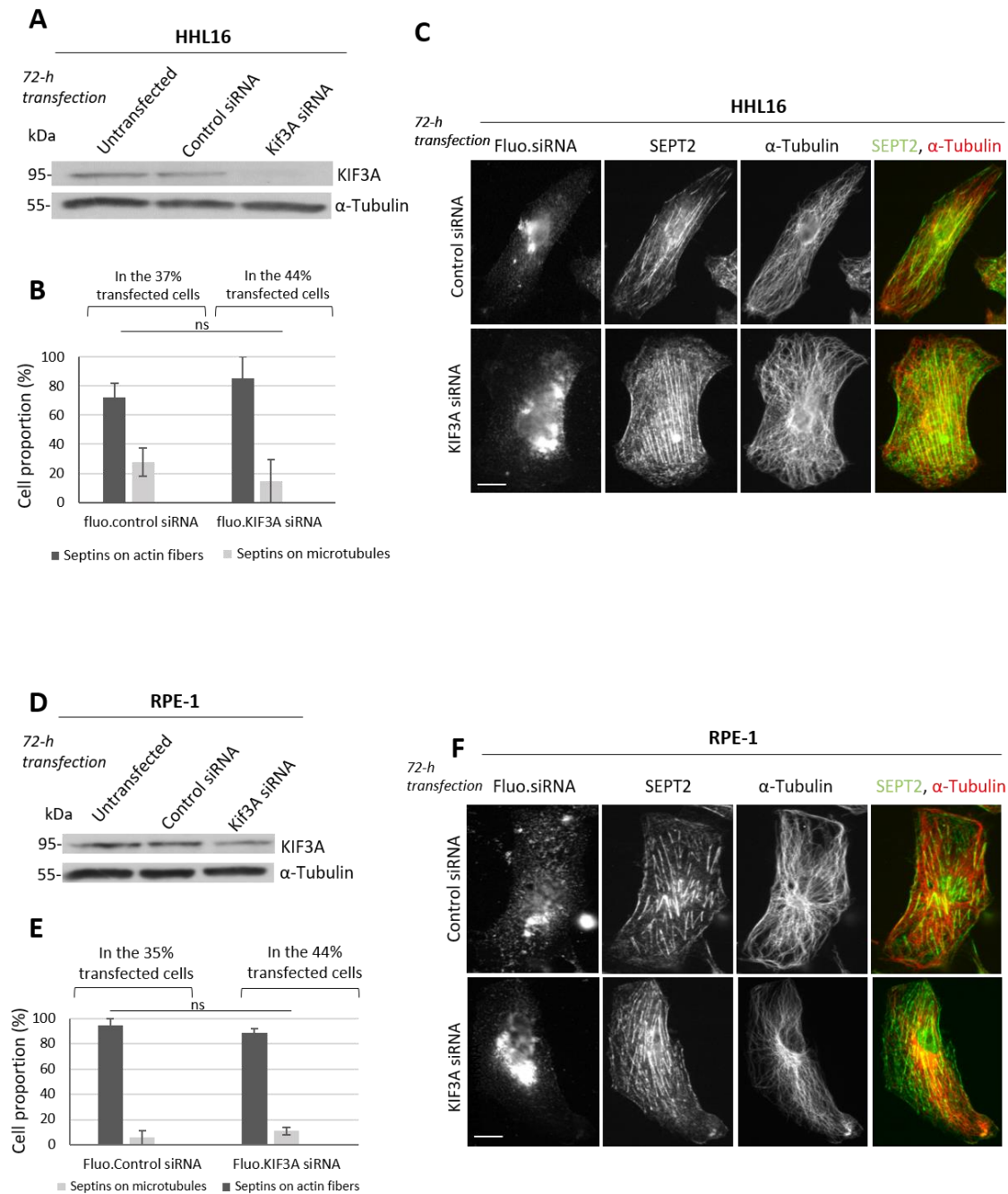
### Fig.5 Septin filament formation is independent of Rab5

**(A and D)** Immunoblots evidencing the decrease of Rab5a levels upon siRNA transfection (HHL16 and RPE-1  $n=1$ ). **(B and E)** Immunostainings showing the endogenous SEPT2 colocalizing with actin stress fibers in both control siRNA and Rab5a siRNA transfected HHL16 and RPE-1 cells. **(C and F)** Proportions of cells displaying septin filaments on actin or on MTs after the indicated transfections ( $n=2$  for HHL1- and RPE-1 cells with about 300 cells analyzed per condition). The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analysis was made using chi-square tests; ns= not significant. Scale bars = 10  $\mu$ m

### **Septin filament location on actin stress fibers involves a kinesin-dependent transport along microtubules**

By analogy with *Ustilago Maydis* (Zander et al., 2016), a kinesin-dependent step could be required for efficient septin annealing at the plasma membrane (Bridges et al., 2014), (Bertin et al., 2010), (Beber et al., 2019) (**Fig.9** point 1). To evaluate the role of MT-associated motor proteins in septin final cellular localization, we proceeded to knockdown KIF3A, a kinesin-2 family member known for its role in the centrifugal transport of early endosomes (Pupo et al., 2018), late endocytic membranes and lysosomes (Brown et al., 2005) and in endocytic recycling (Schonteich et al., 2008) (**Fig. 6A** and **D** in HHL16 and RPE-1 cells, respectively). Using a fluorescent KIF3A siRNA, we could precisely evaluate its effect on septin filament location in the transfected cells and concluded that septin localization was not significantly affected (**Fig.6B** and **E**). Cells transfected with the fluorescent control siRNA (37% and 35% of the total cell population of HHL16 and RPE-1, respectively) presented the two localization phenotypes of septin filaments, on actin fibers or on MTs, even in RPE-1 cells (about 6% of the latter phenotype), perhaps due to transfection-mediated stress. In both cell lines, KIF3A siRNA transfection (44% of the total cell population of HHL16 and RPE-1) did not lead to significant septin filaments relocation to MTs. The cells transfected with KIF3A siRNA majorly presented septin filaments on actin stress fibers ( $85 \pm 15\%$  in HHL16 cells and  $89 \pm 3\%$  in RPE-1 cells; **Fig.6C** and **F** middle panels), while the minority of the cell population presented septin filaments on MTs ( $15 \pm 15\%$  in HHL16 cells and in  $11 \pm 3\%$  in RPE-1 cells) (**Fig.6C** and **F** bottom panels). At this stage, we could not evidence that a KIF3A-dependent traffic could impair septin targeting to stress fibers. Nevertheless, septin oligomers or components facilitating septin filament elongation and targeting to stress fibers might be transported towards the plasma membrane by other kinesin motors through non-endosomal trafficking pathways. To further investigate the possibility that a centrifugal transport of endocytic membranes could be involved, it would be worth testing whether septins are present on AP-3 positive early endosomes (Traikov et al., 2014), on macropinosomes (Dolat and Spiliotis, 2016), or on vesicles rich in phosphoinositides which septins can bind to (Dolat and Spiliotis, 2016; Kouranti et al., 2006; Bertin et al., 2010; Omrane et al., 2019)

## Microtubule-dependent targeting of septins

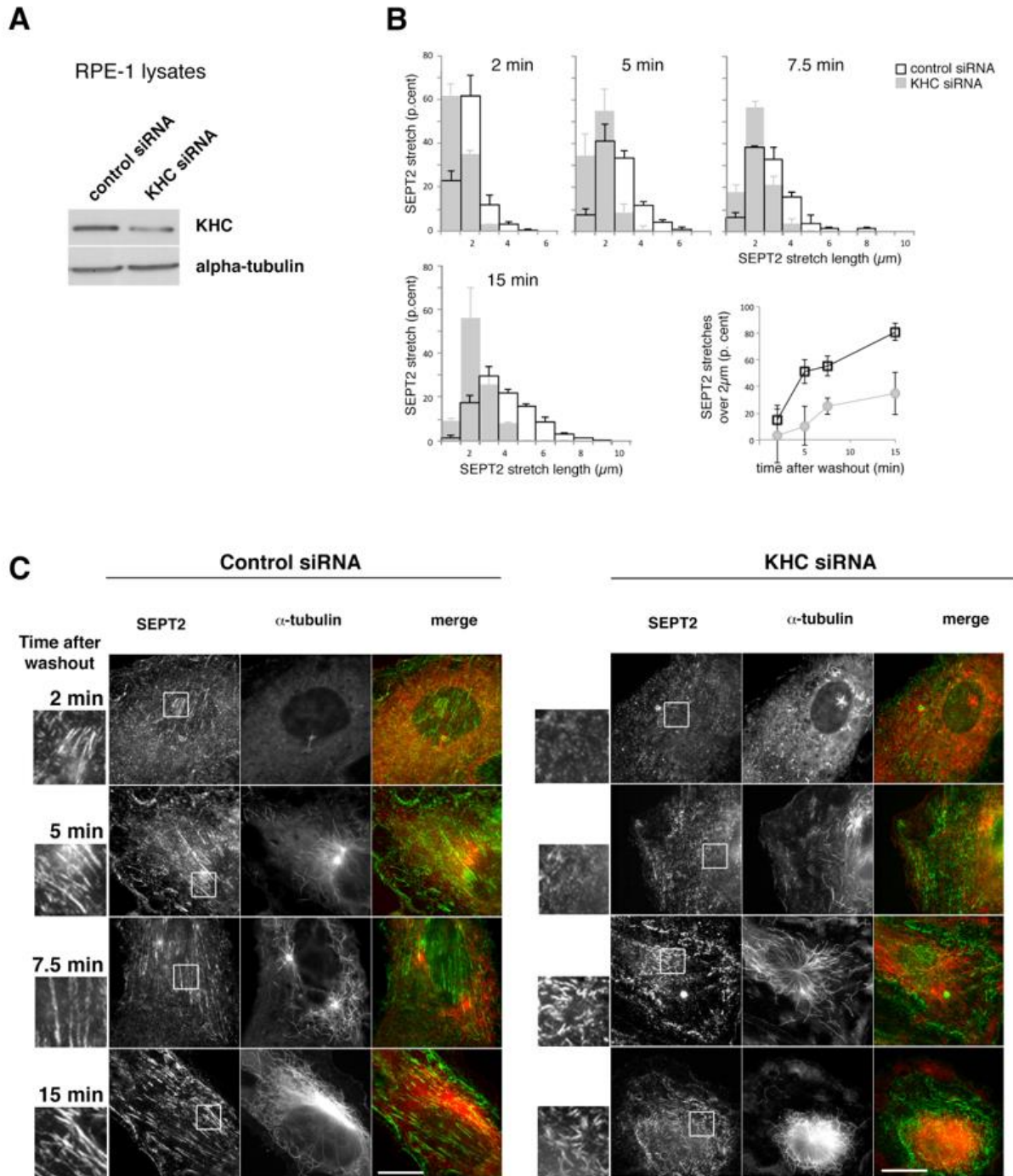


**Fig. 6 KIF3A knockdown does not cause the loss of septin filaments from stress fibers**

(A and D) Western blot of KIF3A in cell lysates transfected either with control or KIF3A siRNA. Tubulin was used as a loading control (n=3 HHL16 cells, n=2 RPE-1 cells). (B and E) Quantification of cells presenting septin filaments on actin or on microtubules (n=2, 60 HHL16 cells containing fluorescent siRNA analyzed per condition and 70 RPE-1 cells) (C and F) Immunofluorescent images of endogenous SEPT2 in cells subjected or not to KIF3A inhibition (n=2 for both cell lines) The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analysis was made using chi-square tests; ns= not significant. Scale bars = 10  $\mu$ m

We further explored the kinesin hypothesis by inhibiting the kinesin-1 KIF5B (**Fig. 7A**). As a steady-state inhibition did not exhibit any perturbation of septin delivery to actin stress fibers just like with KIF3A (not shown), we proceeded to perform similar knockdown experiments in cells that were subjected in parallel to a constrained MT regrowth after nocodazole-washout (Marceiller et al., 2005). This procedure was intended to limit the extent of the MT network and to try to identify potential intermediate MT-binding step of septin location, en route to the actin stress fibers. **Figure 7** shows that during the 15-min time course of MT network rebuilding, septins early reorganized into stretches that progressively extended along stress fibers in the control condition but that failed to coalign with them in KIF5B-depleted cells (**Fig. 7B** and **C**). Also, kinesin-1 inhibition delayed the formation of long septin stretches as septin labeling was more punctate at early washout times and only displayed a few linear structures compared to controls. This delayed septin filament elongation and targeting to stress fibers revealed the involvement of a KIF5B-mediated transport step in subcellular septin localization on actin. Meanwhile, no noticeable co-alignment of septin stretches with MTs could be detected. This result could not exclude that other kinesins might also be involved. Indeed, septins are capable of interacting directly with kinesins, as reported with the kinesin-7 CENP-E that physically interacts with SEPT2 and SEPT7 (Spiliotis et al., 2005), (Zhu et al., 2008) and with the kinesin-2 KIF17 found to interact with SEPT9 (Bai et al., 2016).





**Fig. 7 KIF5B knockdown delays septin re-association with stress fibers upon constrained microtubule regrowth following nocodazole washout**

(A) Western-blot showing the decreased expression of KIF5B in RPE-1 cell lysates. (B-C) After 72-h RNAi, cells were subjected to a combined nocodazole ( $10\mu\text{M}$ ) and cold-mediated MT disassembly, then subjected to nocodazole washout in the presence of  $0.5\mu\text{M}$  residual nocodazole to slow Mt regrowth and septin relocalization. After cell fixation and consecutive endogenous SEPT2 and alpha-tubulin labelings at the indicated time points (C), the distributions of the SEPT2 stretches lengths were measured and reported into histograms (B). The curves represent the increase in SEPT2 stretch length over  $2\mu\text{M}$  as a function of time after nocodazole washout. Scale bars =  $10\mu\text{m}$ .

### **Septin filament location on actin stress fibers requires a dynein-dependent transport**

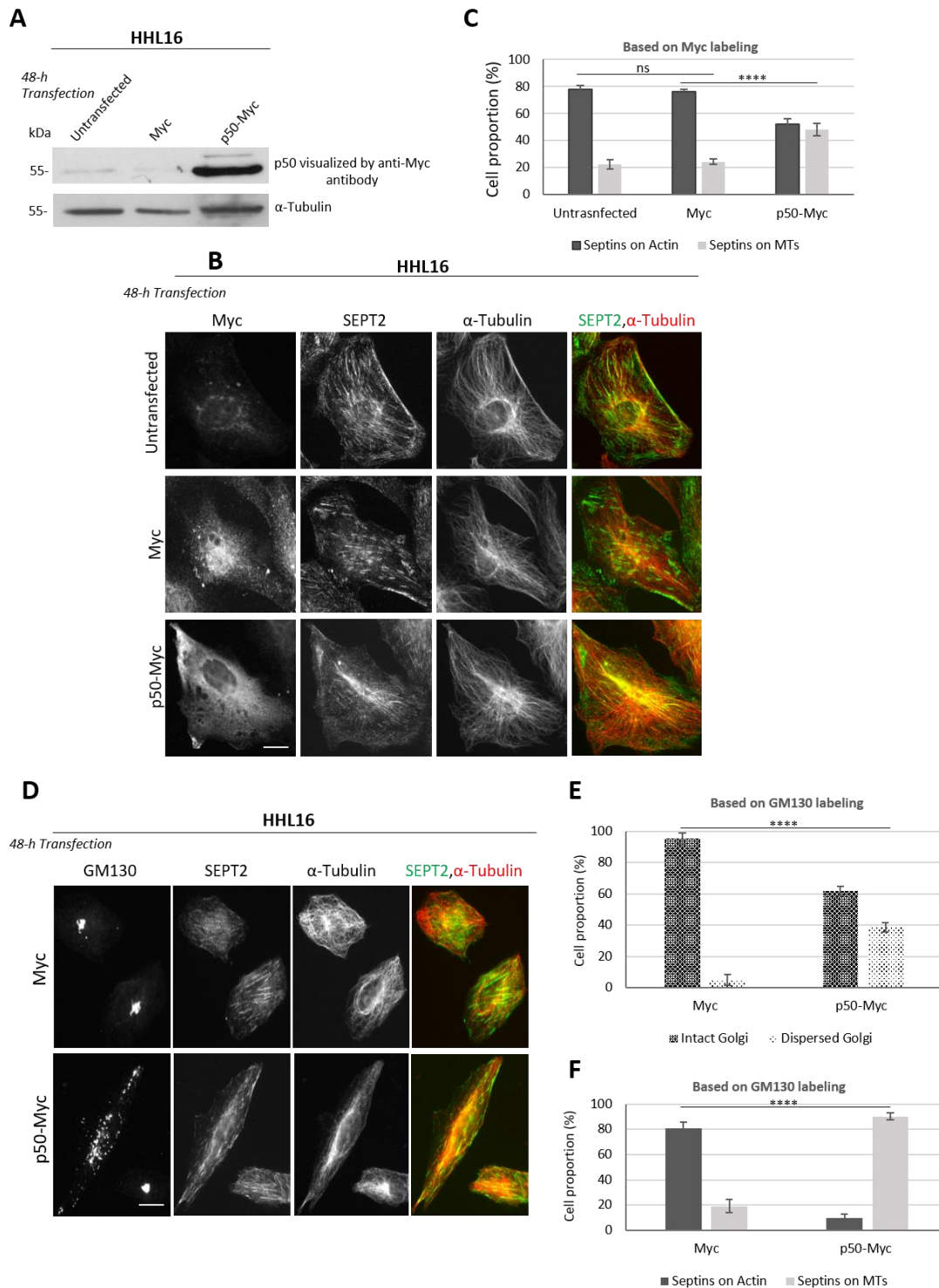
Since MTs function upstream of the targeting of septins to actin stress fibers, another possibility is that a minus end-directed traffic along MTs could participate in the delivery of septin filaments from the plasma membrane to actin stress fibers (**Fig.9** point 2). To test this hypothesis, we proceeded to block the minus-end molecular motor dynein. Dynactin is a protein complex linking dynein to MTs and to its cargo. By overexpressing Myc-tagged p50 dynamitin, a dynactin subunit, we disrupted the dynein-dynactin complex, which also resulted in parallel in the dispersion of the Golgi apparatus (Burkhardt et al., 1997) (**Fig. 8A** and **D**). Interestingly, the overexpression of p50 dynamitin (**Fig.8B**) doubled the percentage of cells that presented septin filaments colocalizing with MTs relative to controls (**Fig. 8C**). In order to avoid the confusion in immunofluorescence experiments between the labeling of the endogenous c-Myc and that of the overexpressed plasmids, we marked the Golgi apparatus to detect organelle disruption, and therefore transfected cells (**Fig. 8D**). Control cells present mostly a compact Golgi apparatus (**Fig.8D** top panel as well as bottom panel, right cell) and septin filaments that coalign with actin. A minority of the control cells, perhaps in the G2/M phase of the cell cycle, displayed a scattered GM130 signal (almost 5% **Fig.8E**) but in the case of p50 dynamitin overexpression (**Fig.8D** bottom panel, cell on the left), the Golgi apparatus was completely scattered throughout the cytoplasm in almost 40% of the cells (**Fig.8E**). Based on this phenotype, almost every cell overexpressing p50 dynamitin strikingly displayed septin filaments along MTs (**Fig. 8F**). Surprisingly, instead of finding our septins stuck at the plasma membrane unable to reach actin fibers, septin filaments in the case of dynein disruption led to their location on MTs (**Fig. 9** point 2). These results highlight the importance of a dynein-dependent transport in septin filament delivery to actin microfilaments. A physical interaction between SEPT9 and a dynein intermediate chain was recently evidenced. Indeed, GDP-bound SEPT9\_i1 has been proposed to drive dynein recruitment to various membrane organelles and has been implicated in maintaining the good functioning of the dynein/dynactin complex without the need of being integrated in octamers (Kesisova et al., 2020)

Further studies need to be done to understand how septin filaments switch from MTs to actin (**Fig.9** point 3). We should also take a closer look into motor proteins linking both actin and MTs such as CHO1/MKLP1/KIF23 (Kuriyama et al., 2002), as well as Protein Kinase A signaling



## Microtubule-dependent targeting of septins

events previously shown to regulate the switching of cargos between MTs and actin fibers (Rodionov et al., 2003).

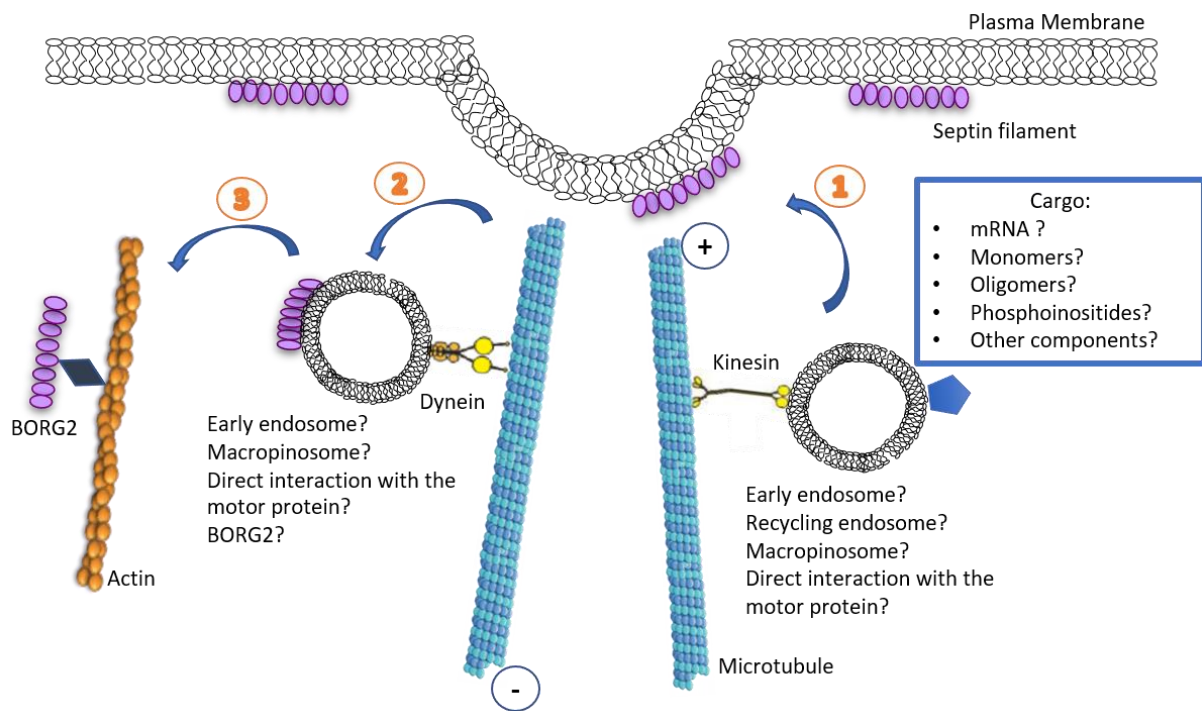


**Fig. 8 Dynein inhibition causes septin filament relocation from actin to MTs in HHL16 cells**

(A) Overexpressed p50/dynamitin-Myc as revealed, 48 h after transfection by an anti-Myc antibody (n=2) (B) Immunofluorescent images of the location of endogenous SEPT2 when p50 is overexpressed (detected by the Myc antibody) versus control conditions (n=6) (C) Quantification of cells with septins

## Microtubule-dependent targeting of septins

either completely on actin or on MTs upon p50 or control plasmid expression based on Myc labeling (n=6 between 600 and 900 cells were analyzed per condition) (D) Immunofluorescent images of cells overexpressing p50 detected by the scattered Golgi GM130 labeling. The subcellular location of endogenous SEPT2 was detected. (E) Quantification of cells with intact or dispersed Golgi after expression of control or p50 plasmid (n=2, between 120 and 300 cells analyzed per condition) (F) Quantification of D: Number of cells with septins either completely on actin or MTs upon p50 expression or control plasmid expression (n=2 between 130 and 190 cells were analyzed per condition). The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of cell proportions for the indicated number of experiments. Statistical analysis was made using chi-square tests; \*\*\*\*=  $p < 0.0001$ . Scale bars = 10  $\mu$ m



**Fig. 9 Hypothetical model of the role that microtubules might have in septin filament location on actin fibers**

In this study, we demonstrate that MTs are indispensable for septin filaments to associate with actin fibers via the action of their motor proteins. However, the different motor proteins implicated, the nature of the cargo transported as well as the way septin filaments switch from MTs to actin still need to be determined.

## **Materials and Methods:**

### ***Cell culture:***

Experiments were performed on human immortalized hepatocyte cells HHL16 and immortalized retinal pigment epithelial cells RPE-1. All cells were cultured with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco™ DMEM, Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Dutscher, Type of serum: 500105RR, Batch N°S15642S1810), 1% antibiotic-antifungal mixture (Gibco) and 1% L-glutamine (Sigma, Darmstadt, Germany). Sensitive human breast carcinoma cell line MDA-MB 231 were continuously cultured with Verapamil and without or with paclitaxel at 3 times the IC<sub>50</sub> (25nM) as previously described (Froidevaux-Klipfel et al., 2011).

### ***Treatments:***

Paclitaxel (Sigma) treatment at a concentration corresponding to 3x the IC<sub>50</sub> for the drug in both HHL16 (5nM) and RPE-1 (10nM) cells lasted for 24h at 37°C in the presence of 10µM Verapamil (Sigma) in order to block the expulsion of the drug by the efflux pumps (McTavish and Sorokin, 1989). Our control cells were only treated with the same concentration of Verapamil.

Actin depolymerization was executed by cytochalasin B (Sigma) treatment at 10µg/mL for 30min at 37°C. After cytochalasin B has been washout with cold culture medium as a first rinse, the reformation of the septin and actin networks was analyzed at 2, 10 or 30min after the cold medium has been replaced with 37°C fresh one.

To achieve microtubule (MT) depolymerization, cells were either treated with 10µM nocodazole (Sigma) for 3.5h at 37°C, put on ice for 3.5h, or subjected to a combination of both treatments: cells were treated with 10µM nocodazole for 1.5h at 37°C followed by 2h on ice without removing the drug. After nocodazole washout, the septin network reformation was analyzed in the presence of 250nM of nocodazole to slowdown MT regrowth.

### ***Transfections:***

Fourty eight hours prior to analysis, HHL16 cells were transfected in a 6 or 12-well plate with respectively 1 or 0.5µg/mL of either the pCMV-Myc control plasmid or the p50-Myc plasmid using Turbofect® reagent (ThermoFischer, Illkirch, France), according to the manufacturer's

## Microtubule-dependent targeting of septins

instructions. Short interfering RNA (siRNA) transfections were performed using the HiPerFect reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions with an RNA concentration of 100nM 72h prior to analysis. Rab5a (Mission<sup>®</sup> siRNA, forward: CAGCCAUAGUUGUAUAUGA, reverse: UCAUAUACAACUAUGGCUG) and fluorescent KIF3A (Mission<sup>®</sup> siRNA, forward: [6FAM]-GCUGCGAUAUGUGAAGGU, reverse: ACCUUCACAUUAUCGCAGC) siRNAs, as well as the fluorescent nonsilencer (Mission<sup>®</sup> siRNA, [6FAM]-SIC 007) siRNA used as a negative control in the KIF3A silencing experiments were all purchased from Sigma. The nonsilencer siRNA (D-001810-10-50) used in the Rab5 silencing experiments was from Dharmacon.

### ***Immunoblotting:***

Cell lysates were prepared by directly scraping cells in lysis buffer and further treated as described in (Froidevaux-Klipfel et al., 2011), before constant protein amounts were loaded onto gels for analysis. Blots were probed with selected primary antibodies directed against:  $\alpha$ -Tubulin (clone DM1A, Sigma), Actin (Ref sc-47778, Santa Cruz), SEPT9 (Ref 10769-1-AP, Proteintech), Myc (clone 9E10, Sigma), KIF3A (Ref 134434, GeneTex) or Rab5 (Ref 3547S, Cell Signaling). Protein bands were visualized with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (anti-mouse-HRP- Ref 7076 and anti-rabbit HRP - Ref 7074, Cell signaling) and the ECL detection kit (Pierce, ThermoFischer).

### ***Immunofluorescence and microscopy:***

Cells grown on glass coverslips were stained using Phalloidin-TRITC (Ref P1951, Sigma), or immunolabeled using primary anti- $\alpha$ -Tubulin (F2C, a kind gift of Dr Franck Perez Institut Curie, Paris61), primary anti-SEPT2 (Ref HPA018481, Sigma), primary anti-GM130 (Ref: 610822, BD Transduction Laboratories) or the same anti-Myc antibody as described above after fixation with 3.75% paraformaldehyde/PBS and permeabilization with 0.1% Triton X-100/PBS. Secondary antibodies were Alexa Fluor 488- or 555-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgGs (Molecular Probes) and Cyanine 5- conjugated antibody against human IgGs (Jackson ImmunoResearch). When present, the Myc tag was labeled first. Images were acquired using a Leica DMLB microscope (40 or 100  $\times$  1.3 NA objective). Image acquisitions were performed using a Scion CFW1312M CCD camera driven from an Apple iMac computer and homemade software. Data were quantified using the ImageJ software.

***Statistical analysis:***

Otherwise indicated, quantitative data are the means  $\pm$  s.e.m. of at least three independent experiments. The proportions of cells that displayed septin filaments, either on actin fibers or on MTs, were evaluated by  $\chi^2$  tests. In this context, the numbers of cells taken into account for statistical comparisons were the sum of those counted in at least three independent experiments. The following symbols were used: ns, not significant and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . For each quantification of septin subcellular distribution (on actin fibers or on MTs), between 60 and 900 cells per condition were analyzed.

**References:**

- Allan, V.J. 2011. Cytoplasmic dynein. *Biochemical Society Transactions*. 39:1169–1178. doi:10.1042/BST0391169.
- Auxier, B., J. Dee, M.L. Berbee, and M. Momany. 2019. Diversity of opisthokont septin proteins reveals structural constraints and conserved motifs. *BMC Evol Biol*. 19:4. doi:10.1186/s12862-018-1297-8.
- Bai, X., E.P. Karasmanis, and E.T. Spiliotis. 2016. Septin 9 interacts with kinesin KIF17 and interferes with the mechanism of NMDA receptor cargo binding and transport. *Mol Biol Cell*. 27:897–906. doi:10.1091/mbc.E15-07-0493.
- Beber, A., C. Taveneau, M. Nania, F.-C. Tsai, A. Di Cicco, P. Bassereau, D. Lévy, J.T. Cabral, H. Isambert, S. Mangenot, and A. Bertin. 2019. Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments. *Nat Commun*. 10:420. doi:10.1038/s41467-019-08344-5.
- Bertin, A., M.A. McMurray, L. Thai, G. Garcia, V. Votin, P. Grob, T. Allyn, J. Thorner, and E. Nogales. 2010. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J. Mol. Biol*. 404:711–731. doi:10.1016/j.jmb.2010.10.002.
- Bowen, J.R., D. Hwang, X. Bai, D. Roy, and E.T. Spiliotis. 2011. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *J. Cell Biol*. 194:187–197. doi:10.1083/jcb.201102076.
- Bridges, A.A., H. Zhang, S.B. Mehta, P. Occhipinti, T. Tani, and A.S. Gladfelter. 2014. Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:2146–2151. doi:10.1073/pnas.1314138111.
- Brown, C.L., K.C. Maier, T. Stauber, L.M. Ginkel, L. Wordeman, I. Vernos, and T.A. Schroer. 2005. Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes. *Traffic*. 6:1114–1124. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00347.x.
- Burkhardt, J.K., C.J. Echeverri, T. Nilsson, and R.B. Vallee. 1997. Overexpression of the Dynamitin (p50) Subunit of the Dynactin Complex Disrupts Dynein-dependent Maintenance of Membrane Organelle Distribution. *Journal of Cell Biology*. 139:469–484. doi:10.1083/jcb.139.2.469.
- Calvo, F., R. Ranftl, S. Hooper, A.J. Farrugia, E. Moeendarbary, A. Bruckbauer, F. Batista, G. Charras, and E. Sahai. 2015. Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep*. 13:2699–2714. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.052.
- Dolat, L., J.L. Hunyara, J.R. Bowen, E.P. Karasmanis, M. Elgawly, V.E. Galkin, and E.T. Spiliotis. 2014. Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *J. Cell Biol*. 207:225–235. doi:10.1083/jcb.201405050.
- Dolat, L., and E.T. Spiliotis. 2016. Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion. *J Cell Biol*. 214:517–527. doi:10.1083/jcb.201603030.
- Fourriere, L., A.J. Jimenez, F. Perez, and G. Boncompain. 2020. The role of microtubules in secretory protein transport. *J Cell Sci*. 133:jcs237016. doi:10.1242/jcs.237016.

## Microtubule-dependent targeting of septins

- Froidevaux-Klipfel, L., F. Poirier, C. Boursier, R. Crépin, C. Poüs, B. Baudin, and A. Baillet. 2011. Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics*. 11:3877–3886. doi:10.1002/pmic.201000789.
- Froidevaux-Klipfel, L., B. Targa, I. Cantaloube, H. Ahmed-Zaïd, C. Poüs, and A. Baillet. 2015. Septin cooperation with tubulin polyglutamylolation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget*. 6:36063–36080. doi:10.18632/oncotarget.5373.
- Fung, K.Y.Y., L. Dai, and W.S. Trimble. 2014. Cell and Molecular Biology of Septins. In *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier. 289–339.
- Granger, E., G. McNee, V. Allan, and P. Woodman. 2014. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin Cell Dev Biol*. 31:20–29. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.011.
- Hartwell, L. 1971. Genetic control of the cell division cycle in yeast \*1V. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*. 69:265–276. doi:10.1016/0014-4827(71)90223-0.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews*. 91:119–149. doi:10.1152/physrev.00059.2009.
- Joo, E., M.C. Surka, and W.S. Trimble. 2007. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev. Cell*. 13:677–690. doi:10.1016/j.devcel.2007.09.001.
- Kesisova, I.A., B.P. Robinson, and E.T. Spiliotis. 2020. A septin GTPase scaffold of dynein-dynactin motors triggers retrograde lysosome transport (Cell Biology), Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.01.128488v1> [Accessed June 02, 2020].
- Kim, M.S., C.D. Froese, M.P. Estey, and W.S. Trimble. 2011. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol*. 195:815–826. doi:10.1083/jcb.201106131.
- Kinoshita, M. 2003. The septins. *Genome Biol*. 4:236. doi:10.1186/gb-2003-4-11-236.
- Kinoshita, M., C.M. Field, M.L. Coughlin, A.F. Straight, and T.J. Mitchison. 2002. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell*. 3:791–802. doi:10.1016/s1534-5807(02)00366-0.
- Kinoshita, M., S. Kumar, A. Mizoguchi, C. Ide, A. Kinoshita, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, and M. Noda. 1997. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev*. 11:1535–1547. doi:10.1101/gad.11.12.1535.
- Klinkert, K., and A. Echard. 2016. Rab35 GTPase: A Central Regulator of Phosphoinositides and F-actin in Endocytic Recycling and Beyond. *Traffic*. 17:1063–1077. doi:10.1111/tra.12422.
- Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud, and A. Echard. 2006. Rab35 Regulates an Endocytic Recycling Pathway Essential for the Terminal Steps of Cytokinesis. *Current Biology*. 16:1719–1725. doi:10.1016/j.cub.2006.07.020.
- Kull, F.J., and S.A. Endow. 2013. Force generation by kinesin and myosin cytoskeletal motor proteins. *J Cell Sci*. 126:9–19. doi:10.1242/jcs.103911.

## Microtubule-dependent targeting of septins

- Kuriyama, R., C. Gustus, Y. Terada, Y. Uetake, and J. Matuliene. 2002. CHO1, a mammalian kinesin-like protein, interacts with F-actin and is involved in the terminal phase of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 156:783–790. doi:10.1083/jcb.200109090.
- Marceiller, J., A. Drechou, G. Durand, F. Perez, and C. Poüs. 2005. Kinesin is involved in protecting nascent microtubules from disassembly after recovery from nocodazole treatment. *Experimental Cell Research.* 304:483–492. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.007.
- Martinez, C., J. Corral, J.A. Dent, L. Sesma, V. Vicente, and J. Ware. 2006. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. *J Thromb Haemost.* 4:1388–1395. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01952.x.
- McTavish, D., and E.M. Sorkin. 1989. Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. *Drugs.* 38:19–76. doi:10.2165/00003495-198938010-00003.
- Mendonça, D.C., J.N. Macedo, S.L. Guimarães, F.L. Barroso da Silva, A. Cassago, R.C. Garratt, R.V. Portugal, and A.P.U. Araujo. 2019. A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton (Hoboken).* 76:457–466. doi:10.1002/cm.21569.
- Mizutani, Y., H. Ito, I. Iwamoto, R. Morishita, H. Kanoh, M. Seishima, and K. Nagata. 2013. Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. *Biol. Chem.* 394:281–290. doi:10.1515/hsz-2012-0258.
- Montagna, C., M. Sagie, and J. Zechmeister. 2015. Mammalian septins in health and disease. *RRBC.* 59. doi:10.2147/RRBC.S59060.
- Mostowy, S., and P. Cossart. 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:183–194. doi:10.1038/nrm3284.
- Nagata, K., A. Kawajiri, S. Matsui, M. Takagishi, T. Shiromizu, N. Saitoh, I. Izawa, T. Kiyono, T.J. Itoh, H. Hotani, and M. Inagaki. 2003. Filament Formation of MSF-A, a Mammalian Septin, in Human Mammary Epithelial Cells Depends on Interactions with Microtubules. *J. Biol. Chem.* 278:18538–18543. doi:10.1074/jbc.M205246200.
- Nishihama, R., M. Onishi, and J.R. Pringle. 2011. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biol. Chem.* 392:681–687. doi:10.1515/BC.2011.086.
- Ochoa, C.D., T. Stevens, and R. Balczon. 2011. Cold exposure reveals two populations of microtubules in pulmonary endothelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 300:L132-138. doi:10.1152/ajplung.00185.2010.
- Omrane, M., A.S. Camara, C. Taveneau, N. Benzoubir, T. Tubiana, J. Yu, R. Guérois, D. Samuel, B. Goud, C. Poüs, S. Bressanelli, R.C. Garratt, A.R. Thiam, and A. Gassama-Diagne. 2019. Septin 9 has Two Polybasic Domains Critical to Septin Filament Assembly and Golgi Integrity. *iScience.* 13:138–153. doi:10.1016/j.isci.2019.02.015.
- Peterson, E.A., and E.M. Petty. 2010. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin. Genet.* 77:511–524. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01392.x.
- Poüs, C., L. Klipfel, and A. Baillet. 2016. Cancer-Related Functions and Subcellular Localizations of Septins. *Front Cell Dev Biol.* 4:126. doi:10.3389/fcell.2016.00126.



## Microtubule-dependent targeting of septins

- Pupo, E., D. Avanzato, M. Scianna, A. Oldani, G. Serini, and L. Lanzetti. 2018. Kinesin-2 Controls the Motility of RAB5 Endosomes and Their Association with the Spindle in Mitosis. *Int J Mol Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19092575.
- Rodionov, V., J. Yi, A. Kashina, A. Oladipo, and S.P. Gross. 2003. Switching between microtubule- and actin-based transport systems in melanophores is controlled by cAMP levels. *Curr Biol.* 13:1837–1847. doi:10.1016/j.cub.2003.10.027.
- Schonteich, E., G.M. Wilson, J. Burden, C.R. Hopkins, K. Anderson, J.R. Goldenring, and R. Prekeris. 2008. The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling. *Journal of Cell Science.* 121:3824–3833. doi:10.1242/jcs.032441.
- Sellin, M.E., S. Stenmark, and M. Gullberg. 2012. Mammalian SEPT9 isoforms direct microtubule-dependent arrangements of septin core heteromers. *Mol. Biol. Cell.* 23:4242–4255. doi:10.1091/mbc.E12-06-0486.
- Shankar, J., A. Messenberg, J. Chan, T.M. Underhill, L.J. Foster, and I.R. Nabi. 2010. Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *Cancer Res.* 70:3780–3790. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4439.
- Sirajuddin, M., M. Farkasovsky, F. Hauer, D. Kühmann, I.G. Macara, M. Weyand, H. Stark, and A. Wittinghofer. 2007. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature.* 449:311–315. doi:10.1038/nature06052.
- Smith, C., L. Dolat, D. Angelis, E. Forgacs, E.T. Spiliotis, and V.E. Galkin. 2015. Septin 9 Exhibits Polymorphic Binding to F-Actin and Inhibits Myosin and Cofilin Activity. *J. Mol. Biol.* 427:3273–3284. doi:10.1016/j.jmb.2015.07.026.
- Soroor, F., M.S. Kim, O. Palander, Y. Balachandran, R.F. Collins, S. Benlekbir, J. Rubinstein, and W.S. Trimble. 2020. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in-vitro polymerization properties. *Mol Biol Cell.* mbcE20060398. doi:10.1091/mbc.E20-06-0398.
- Spiliotis, E.T., S.J. Hunt, Q. Hu, M. Kinoshita, and W.J. Nelson. 2008. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* 180:295–303. doi:10.1083/jcb.200710039.
- Spiliotis, E.T., M. Kinoshita, and W.J. Nelson. 2005. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science.* 307:1781–1785. doi:10.1126/science.1106823.
- Surka, M.C., C.W. Tsang, and W.S. Trimble. 2002. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 13:3532–3545. doi:10.1091/mbc.e02-01-0042.
- Targa, B., L. Klipfel, I. Cantaloube, J. Salameh, B. Benoit, C. Poüs, and A. Baillet. 2019. Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9\_i1 and tubulin polyglutamylation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel. *Cell Death Dis.* 10:54. doi:10.1038/s41419-019-1318-6.
- Tooley, A.J., J. Gilden, J. Jacobelli, P. Beemiller, W.S. Trimble, M. Kinoshita, and M.F. Krummel. 2009. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat. Cell Biol.* 11:17–26. doi:10.1038/ncb1808.

## Microtubule-dependent targeting of septins

- Traikov, S., C. Stange, T. Wassmer, P. Paul-Gilloteaux, J. Salamero, G. Raposo, and B. Hoflack. 2014. Septin6 and Septin7 GTP Binding Proteins Regulate AP-3- and ESCRT-Dependent Multivesicular Body Biogenesis. *PLoS ONE*. 9:e109372. doi:10.1371/journal.pone.0109372.
- Xu, Z., L. Schaedel, D. Portran, A. Aguilar, J. Gaillard, M.P. Marinkovich, M. Théry, and M.V. Nachury. 2017. Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science*. 356:328–332. doi:10.1126/science.aai8764.
- Zander, S., S. Baumann, S. Weidtkamp-Peters, and M. Feldbrügge. 2016. Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J Cell Sci*. 129:2778–2792. doi:10.1242/jcs.182824.
- Zhang, J., C. Kong, H. Xie, P.S. McPherson, S. Grinstein, and W.S. Trimble. 1999. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol*. 9:1458–1467. doi:10.1016/s0960-9822(00)80115-3.
- Zhu, M., F. Wang, F. Yan, P.Y. Yao, J. Du, X. Gao, X. Wang, Q. Wu, T. Ward, J. Li, S. Kioko, R. Hu, W. Xie, X. Ding, and X. Yao. 2008. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J. Biol. Chem*. 283:18916–18925. doi:10.1074/jbc.M710591200.

## Discussion générale et perspectives

La 'American Cancer Society' a estimé à plus de 1.8 millions de nouveaux cas de cancers aux États-Unis en 2020 et à plus de 600 000 nouveaux décès (Siegel et al., 2020). En France, en 2017 et en considérant uniquement les tumeurs malignes, le nombre de nouveaux cas de cancers estimé était de 399 500 et le nombre de décès de 150 000 (Cowppli-Bony et al., 2019). Les différents travaux de recherche menés mondialement sur les différents types de cancers ont contribué à la diminution du taux de mortalité de 29% entre 1997 et 2017 aux États-Unis (Siegel et al., 2020). Cependant, les chiffres de décès restent importants d'où la nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, des indicateurs précoces de mauvais pronostic ainsi que les facteurs participants à la résistance aux traitements anticancéreux mis sur le marché.

Un des anticancéreux les plus connus est le paclitaxel (Taxol®), un stabilisateur des microtubules (MTs) appartenant à la famille des taxanes. En se fixant sur la  $\beta$ -tubuline dans la lumière du MT (Rao et al., 1995), le paclitaxel favorise la polymérisation des hétérodimères de tubulines en empêchant leur dissociation, bloquant ainsi le cycle cellulaire dans la phase G2/M (Schiff and Horwitz, 1980). Il est l'un des agents chimiothérapeutiques conventionnels les plus fréquemment prescrits surtout en cas de cancers des ovaires (Menzin et al., 1994), du sein (Piccart and Cardoso, 2003), de carcinomes épidermoïdes de la vessie et de cancers de la tête et du cou (Zhu and Chen, 2019). Bien que la chimiothérapie joue un rôle primordial dans la prise en charge des cancers, son efficacité est diminuée par la résistance innée ou acquise des cellules cancéreuses au traitement. En effet, un traitement par du paclitaxel chez un patient atteint de cancer du sein possède un taux d'efficacité qui varie entre 30 et 70% (Rivera and Gomez, 2010) alors qu'un traitement par du paclitaxel chez un patient atteint d'un carcinome hépatocellulaire n'a pas d'effet significatif (Chao et al., 1998).

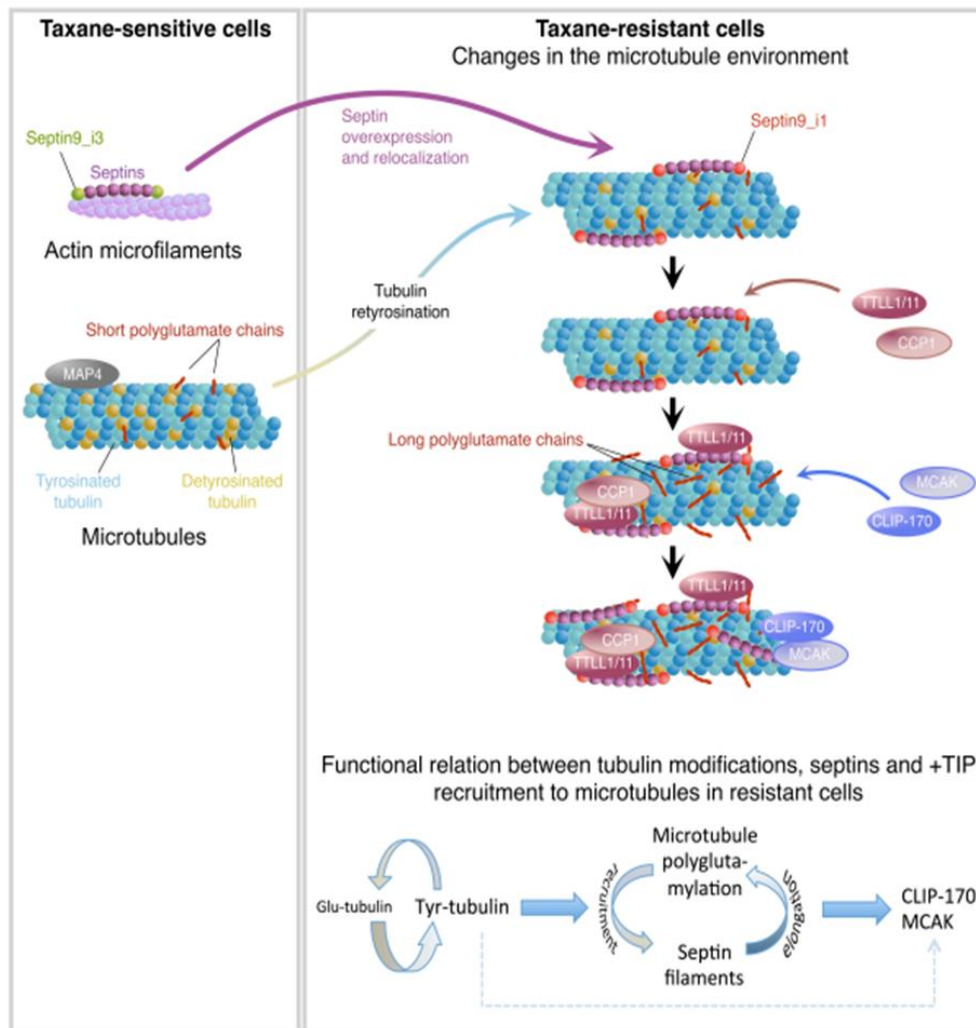
Plusieurs évènements participant à la résistance au paclitaxel ont déjà été identifiés tels que la surexpression des pompes d'efflux éjectant ainsi la drogue en dehors de la cellule (Hopper-Borge et al., 2004);(Fojo and Menefee, 2005), la surexpression des isotypes I, IVa et III de la  $\beta$ -tubuline (Kavallaris et al., 1997; Hasegawa et al., 2003 ; Lebok et al., 2016; Person et al., 2017 ; Martinelli et al., 2018) qui possèdent de grandes capacités dynamiques susceptibles de compenser les effets stabilisateurs du paclitaxel (Pamula et al., 2016), ainsi que des mutations de la  $\beta$ -tubuline affectant la fixation du paclitaxel à son site sur les MTs et l'association de différentes MAPs (Microtubule Associated Proteins) contrecarrant aussi l'effet stabilisateur

du paclitaxel (Orr et al., 2003). Récemment, de nouvelles protéines impliquées dans la résistance au paclitaxel ont été identifiées : Les variations dans la séquence nucléotidique de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Ben-Hamo et al., 2019) ainsi que la surexpression du facteur de transcription oncogénique FoxM1 (Carr et al., 2010) qui diminue les événements d'apoptose et favorise l'éjection de la drogue en dehors de la cellule (Huang et al., 2019).

Un nouveau mécanisme de résistance des cellules de carcinome mammaire MDA-MB 231 au paclitaxel a été identifié dans notre laboratoire. La comparaison du protéome de l'environnement microtubulaire des MDA-MB 231 sensibles à celui des MDA-MB 231 rendues résistantes suite à une exposition prolongée à des concentrations croissantes de paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2011), a révélé, dans la lignée résistante, la surexpression de plusieurs septines (SEPT2, 8, 9 et 11) couplée à leur relocalisation subcellulaire de l'actine vers les MTs, ces derniers présentant par ailleurs un enrichissement en tubuline polyglutamylée à longue chaîne et en tubuline (re)tyrosinée (Froidevaux-Klipfel et al., 2015) (**Figure 49**).

Ce mécanisme d'adaptation cellulaire à une exposition à long terme au paclitaxel est caractérisé par un changement d'isoforme majoritaire de SEPT9. Alors que les MDA-MB 231 expriment essentiellement l'isoforme 3 de la SEPT9, la lignée résistante surexprime l'isoforme 1 (SEPT9\_i1), dont la présence a été préalablement corrélée à la résistance des cellules cancéreuses au paclitaxel (Amir and Mabeesh, 2007). SEPT9\_i1 participe aussi, en contrôlant la voie HIF-1 $\alpha$  et par la stabilisation des kinases N-terminales c-Jun, à l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale (Gonzalez et al., 2009 ; Amir et al., 2010) ; Golan and Mabeesh, 2013). Cette isoforme de SEPT9 possède au niveau de son domaine N-terminal les motifs K/R-x-x-E/D et R/K-R-x-E qui se lient aux queues acides de la partie C-terminale de  $\beta$ -tubuline (Sellin et al., 2012 ; Bai et al., 2013), ce qui pourrait favoriser son recrutement aux MTs après traitement par le paclitaxel. Également, une fois associées aux MTs, les septines recrutent les enzymes responsables de l'élongation des chaînes de glutamate, les polyglutamylases TTLL1 ou TTLL11 (Tubuline Tyrosine Ligase Like), ainsi que la déglutamylase CCP1 (Cytosolic Carboxypeptidase), afin de réguler finement la longueur de ces chaînes d'acides glutamiques. Cette association des septines à des MTs à longues chaînes de polyglutamate stimule le recrutement du facteur de sauvetage CLIP-170 et de la kinésine dépolymérisante MCAK sur le MT, ce qui augmente la dynamique de ces MTs en favorisant respectivement la survenue de sauvetages et de catastrophes afin de contrecarrer l'effet

stabilisateur du paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2015). De façon remarquable, l'inhibition de l'expression de chacun de ces acteurs (RNAi des SEPT2, 9, 11, des polyglutamylases TTL1, 5 et 11, de la tubuline tyrosine ligase TTL, ou de la combinaison CLIP-170 et MCAK) ou dans l'autre sens la surexpression des déglutamylases CCP1 ou CCP5, provoquent toutes la réversion de la chimiorésistance des cellules adaptées au paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2015).



**Figure 49: Mécanisme de résistance à long terme au paclitaxel dans les cellules de carcinome mammaire MDA-MB 231**

(Froidevaux-Klipfel et al., 2015)

La résistance au paclitaxel étant un mécanisme multifactoriel, nous avons ensuite voulu établir quelle était la part de ce mécanisme impliquant les septines et la polyglutamylaton de la tubuline dans la chimiorésistance. Nous avons aussi cherché à mieux identifier quels étaient les éléments de ce mécanisme qui fonctionnaient en amont et qui étaient impliqués dans

l'initiation de l'acquisition de la résistance. En effet, il existe une boucle d'amplification entre le recrutement des septines sur les MTs et la polyglutamylation à longue chaîne de la tubuline (**Figure 49**). Nous avons donc surexprimé seuls ou en combinaison les différents éléments intervenant dans ce nouveau mécanisme de résistance dans les MDA-MB 231 chimiosensibles: 1) Les septines et particulièrement les isoformes 1 et 3 de SEPT9, 2) Les enzymes responsables de la polyglutamylation (TTLL5 et TTLL11) ou bien de la tyrosination (TTL), afin d'évaluer leur contribution à la résistance de ces cellules exposées à différentes concentrations de paclitaxel pour 72h (**Tableau 4**) (Targa et al., 2019). Une forte résistance au paclitaxel a été détectée en surexprimant les SEPT2, 6, 7 et 9\_i1 couplées à la surexpression des enzymes TTLL5 et TTLL11. De plus, la surexpression de ces différents éléments a mené à une forte relocalisation des filaments de septines de l'actine vers les MTs. La surexpression conjointe de l'enzyme TTL à celle des septines ou des polyglutamylases n'induit qu'une résistance intermédiaire au paclitaxel. Alors qu'on aurait pu s'attendre à une accentuation du phénotype résistant en surexprimant la TTL en plus de la surexpression des septines et des TTLL5 et 11, la sensibilité des cellules au paclitaxel a au contraire augmenté. Ces résultats indiquent que la résistance induite par la surexpression de TTL résulte d'un mécanisme indépendant de celui mis en évidence par (Froidevaux-Klipfel et al., 2015), montrant encore une fois que la résistance au paclitaxel est multifactorielle. Pour déterminer le caractère général de cette résistance, les facteurs surexprimés induisant la résistance des MDA-MB 231 sensibles à l'exposition aiguë au paclitaxel ont aussi été testés sur d'autres types de cellules cancéreuses : HeLa (col de l'utérus) et HuH7 (hépatome), ainsi que sur d'autres lignées cellulaires immortalisées : RPE-1 (épithélium rétinien) et CHO (fibroblastes d'ovaires d'hamster chinois). Comme pour les MDA-MB 231 sensibles, toutes ces lignées cellulaires ont montré une résistance au paclitaxel en surexprimant les septines dont SEPT9\_i1 et les enzymes responsables de la polyglutamylation avec en parallèle, une relocalisation des septines de l'actine vers les MTs (Targa et al., 2019).

Dans les cellules MDA-MB 231, ce mécanisme de résistance, s'il n'est pas forcé par la surexpression de ses constituants, n'a lieu qu'à la suite d'une exposition chronique et donc d'une adaptation à long terme au paclitaxel. En effet, un traitement aigu par du paclitaxel des MDA-MB 231 sensibles n'induit ni la surexpression des septines (pas même de SEPT9\_i1), ni leur relocalisation, ni une augmentation de la polyglutamylation de la tubuline (Targa et al.,

2019). Les cellules RPE-1 et HHL16, quant à elles, qui expriment à l'état basal des niveaux élevés de SEPT9\_i1, contrairement à la lignée de carcinome mammaire, présentent un comportement différent. En effet, quand elles sont traitées par du paclitaxel à court terme (24h) à une concentration proche de 3 fois l'IC<sub>50</sub>, ces lignées certes ne surexpriment pas les septines et n'accroissent pas la polyglutamylation de la tubuline, mais contrairement au MDA-MB 231 sensibles, relocalisent les filaments de septines de l'actine vers les MTs (Targa et al., 2019 ; Salameh et al., en révision), en parallèle d'une acquisition de résistance au paclitaxel. Ces résultats accentuent l'importance du niveau d'expression de SEPT9\_i1 dans la relocalisation des filaments de septines. Cependant, une expression élevée de SEPT9\_i1 est nécessaire mais ne suffit pas à elle seule à provoquer la relocalisation des septines des fibres d'actine vers les MTs (Targa et al., 2019 ; **Tableau 4**). Ce résultat révèle donc que d'autres éléments cellulaires sont impliqués dans cette relocalisation et dans la capacité des cellules à initier en aigu une résistance au paclitaxel. C'est pourquoi nous avons cherché à mieux comprendre les déterminants moléculaires responsables de la relocalisation subcellulaire des filaments de septines de l'actine vers les MTs après un traitement aigu par du paclitaxel.



**Tableau 4: Impact de la surexpression des différents acteurs du mécanisme de résistance au paclitaxel identifié par (Froidevaux-Klipfel et al., 2015) sur la résistance de différentes lignées cellulaires au paclitaxel et sur la localisation subcellulaire des septines**

Les termes : faible, intermédiaire et forte représentent la résistance des différentes lignées cellulaires au traitement par le paclitaxel alors que le code couleur indique le degré de relocalisation des filaments de septines de l'actine vers les MTs avec vert= pas de relocalisation, orange= relocalisation intermédiaire, rouge : relocalisation complète

Surexpression	Cellules	MDA-MB 231 Sensibles	RPE-1	HeLa	CHO	HuH7
SEPT9_i1		Faible	-	-	-	-
SEPT9_i3		Faible	-	-	-	-
SEPT2,6,7,9_i1		Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire	Faible même à de faibles concentrations de paclitaxel
SEPT2,6,7,9_i3		Faible	-	-	-	-
TTL5, TTL11		Pas de résistance	Pas de résistance	Pas de résistance	Faible résistance à de faibles concentrations de paclitaxel	-
SEPT9_i1,TTL5, TTL11		Faible	-	-	-	-
SEPT9_i3, TTL5, TTL11		Faible	-	-	-	-
SEPT2,6,7,9_i1, TTL5, TTL11		Forte	Forte	Forte	Forte	Intermédiaire uniquement à de faibles concentrations de paclitaxel
SEPT2,6,7,9_i3, TTL5, TTL11		Intermédiaire	-	-	-	-
TTL		Intermédiaire	-	-	-	-
TTL, TTL5, TTL11		Intermédiaire	-	-	-	-
SEPT2,6,7,9_i1, TTL		Intermédiaire	-	-	-	-
SEPT2,6,7,9_i3, TTL		Intermédiaire	-	-	-	-
SEPT2,6,7,9_i1, TTL, TTL5,TTL11		Intermédiaire	-	-	-	-
SEPT2,6,7,9_i3, TTL, TTL5,TTL11		Intermédiaire	-	-	-	-

Dans les HHL16, la relocalisation des filaments de septines a lieu proportionnellement à la concentration de paclitaxel utilisée (Targa et al., 2019 ; Salameh et al., en révision) et à la durée d'exposition des cellules (Salameh et al., en révision). Elle a lieu uniquement à la suite d'un traitement par des membres de la famille des taxanes (paclitaxel et docétaxel) et par

l'épothilone B, mais pas par d'autres traitements stabilisateurs des MTs. En effet, la stabilisation des MTs par des concentrations submicromolaires de nocodazole et de TN-16 (Vasquez et al., 1997 ; Rai et al., 2015) ne relocalise pas les septines vers les MTs. Puisque le site de liaison des épothilones et celui des taxanes se superposent en partie sur la  $\beta$ -tubuline dans la lumière du MT (Kamath and Jordan, 2003), il se peut que cette relocalisation des septines soit spécifiquement la conséquence de la liaison de la drogue à ce site sur les MTs et des changements conformationnels qui en résultent dans l'architecture microtubulaire. Bien que les septines puissent s'associer aussi bien à la membrane plasmique (Bridges et al., 2014), qu'à l'actine (Kinoshita et al., 1997) ou aux MTs (Spiliotis et al., 2008), leur relocalisation subcellulaire vers les MTs n'a pour l'instant été observée qu'en présence de taxanes ou d'épothilones. Les septines ainsi relocalisées se lient préférentiellement à certaines régions d'une sous-population de MTs formant des faisceaux épais, soulignant l'affinité particulière des septines pour ces régions de MTs stabilisés par les taxanes (Bowen et al., 2011 ; Sellin et al., 2012) et/ou un rôle particulier joué par SEPT9 pour promouvoir la formation de ces faisceaux (Bai et al., 2013).

En plus de sa capacité de se lier aux MTs (Bai et al., 2013), SEPT9, via son domaine N-terminal, est aussi capable de se lier à l'actine (Smith et al., 2015). Cette propriété de liaison physique à deux éléments du cytosquelette n'est pas attribuée pour le moment à d'autres septines. Cependant, il existe aussi chez les mammifères des protéines adaptatrices permettant la liaison entre les différentes septines et l'actine : l'anilline durant la cytokinèse (Kinoshita et al., 1997) et en interphase la myosine II (Joo et al., 2007) ainsi que les protéines effectrices de Cdc42, BORG2 (Calvo et al., 2015) et BORG3 (Farrugia et al., 2020).

Les protéines BORG (Binder of RhoGTPase) connues aussi sous le nom de Cdc42EP (Cdc42 Effector Protein) constituent une famille de 5 membres, qui possèdent tous un domaine BH3 (Borg Homology Domain 3) leur permettant la liaison aux septines en reconnaissant l'interface entre les domaines coiled-coil de SEPT6 et SEPT7 (Sheffield et al., 2003). BORG2 est le seul membre de la famille à avoir un site de liaison à l'actine connu et qui ressemble à celui de l'anilline (Calvo et al., 2015), ce qui en fait un bon candidat dans le mécanisme de relocalisation des septines. Récemment, BORG3 a été détecté comme liant également les septines à l'actine (Farrugia et al., 2020) mais rien n'indique la présence d'un site de liaison à l'actine dans sa séquence. Ce n'est que maintenant que de nouveaux BORGs émergent comme liant les

septines à l'actine, peut-être à cause de l'arrivée sur le marché de meilleurs anticorps. Au laboratoire, un anticorps anti-BORG4 montre que ce dernier possède la même localisation que les septines et l'actine (résultat non-montré), que peut-être toutes les BORGs sont capables de lier les septines à l'actine, via un ou des autres sites de liaison à l'actine que celui décrit chez BORG2.

Bien que les fonctions des membres de la famille des BORGs restent sous-explorées, il a été établi que BORG2 favorisait un réarrangement des filaments d'actine et de septines en interphase, nécessaire pour l'acquisition d'un phénotype tumorigène agressif dans les fibroblastes associés au cancer (Calvo et al., 2015). De plus, il a été démontré que BORG5, en colocalisant avec les filaments de septines, contrôlait la directionnalité de la migration cellulaire (Liu et al., 2014), tandis que BORG3 contribuait à l'organisation des fibres d'actine et à la formation de filaments de septines (Farrugia et al., 2020). En effet, la liaison de BORG3 aux septines module l'activité de l'actomyosine et impacte ainsi l'invasion cellulaire et la formation de métastases (Farrugia et al., 2020).

Préalablement, dans la littérature, des études ont montré que l'effet du paclitaxel ne se limite pas aux MTs en mitose ou en interphase mais qu'il est capable d'agir sur le niveau d'expression de plusieurs protéines : il bloque l'expression de VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Lau et al., 1999), de HIF-1 $\alpha$  (Carbonaro et al., 2011) ainsi que du récepteur des androgènes (Darshan et al., 2011), et induit la dégradation d'autres protéines comme Hsp90 (Heat shock protein 90) en induisant son ubiquitination (Murtagh et al., 2006). Dans cette thèse, j'ai pu montrer que le paclitaxel induit la dégradation de la protéine BORG2 par le protéasome et la relocalisation des filaments de septines. Il se peut que le paclitaxel, comme pour le cas d'Hsp90, engendre des modifications post-traductionnelles de BORG2 menant à sa dégradation. En effet, la protéine BORG2 en Western Blot constitue un doublet, dont la bande supérieure s'accumule après blocage du protéasome par le MG132. Une immunoprécipitation de BORG2 après des temps courts d'exposition au paclitaxel, mais avant la dégradation de la protéine par le protéasome, nous permettrait d'analyser les modifications post-traductionnelles présentées par BORG2 dans les cellules traitées. Cette immunoprécipitation nous permettrait aussi d'évaluer les changements éventuels dans l'environnement de BORG2. L'identification de l'interactome de BORG2 dans la cellule par des techniques de ligation ou de biotinylation de proximité permettrait peut-être d'identifier les mécanismes initiateurs

d'une ubiquitination et d'une dégradation. Est-ce que parce qu'il a perdu l'interaction avec l'actine et les septines le rendant non fonctionnel ? Etablir s'il existe une différence notable entre la cinétique de disparition de BORG2 des fibres de stress et sa cinétique de dégradation permettrait peut-être de répondre à cette question.

Dans nos expériences, une inhibition d'expression de BORG2 dans les HHL16 est un élément déclencheur de la relocalisation des septines vers les MTs, et un facteur clé dans la résistance des cellules au traitement aigu par du paclitaxel. De façon intéressante, nous avons retrouvé une diminution du niveau de BORG2 chez les MDA-MB 231 rendues résistantes à long terme au paclitaxel (Froidevaux-Klipfel et al., 2015), ce qui accentue le rôle de BORG2 dans l'induction de la relocalisation des filaments de septines et dans la résistance aux taxanes. Afin de mieux s'assurer que c'est la dégradation de BORG2 qui déclenche la relocalisation des septines et non pas l'inverse, il faudrait aussi comparer étroitement la cinétique de relocalisation des septines en présence de paclitaxel avec la cinétique de dégradation de BORG2. Pour cela, une analyse quantitative plus fine, c'est-à-dire sur des temps très courts, de la relocalisation des septines est sans doute nécessaire. Puisque BORG3 est maintenant reconnue comme une autre protéine qui lie les septines à l'actine en interphase (Farrugia et al., 2020), il serait intéressant de tester l'effet de la déplétion de cette BORG et du reste des membres de la famille BORG sur la localisation subcellulaire des septines ainsi que sur la sensibilité au paclitaxel. Des études précédentes ont montré la nécessité de la présence de BORG2 dans les cellules afin de maintenir l'organisation des septines en filaments sur l'actine (Calvo et al., 2015), mais c'est la première fois qu'il est établi qu'une baisse de l'expression de BORG2 induit le changement de localisation subcellulaire des filaments de septines.

Inversement, en surexprimant BORG2 dans les HHL16, la liaison des septines à l'actine est renforcée, ce qui empêche leur détachement des fibres de stress, même lors d'un traitement par le paclitaxel. On ne trouve BORG2 sur les fibres de stress que dans les cellules ayant aussi leurs septines sur ces structures (Article 2, figure 5B). Il est donc aussi possible de conclure que c'est l'attachement des septines aux fibres de stress qui maintient BORG2 au même endroit et la protège de la dégradation par le protéasome en présence de paclitaxel. Alors que les précédents travaux publiés sur les protéines BORGs montrent leur implication dans le phénotype invasif des tumeurs (Calvo et al., 2015 ; Farrugia and Calvo, 2017 ; Farrugia et al., 2020), nous montrons dans ce travail qu'une diminution de BORG2 induit la résistance des

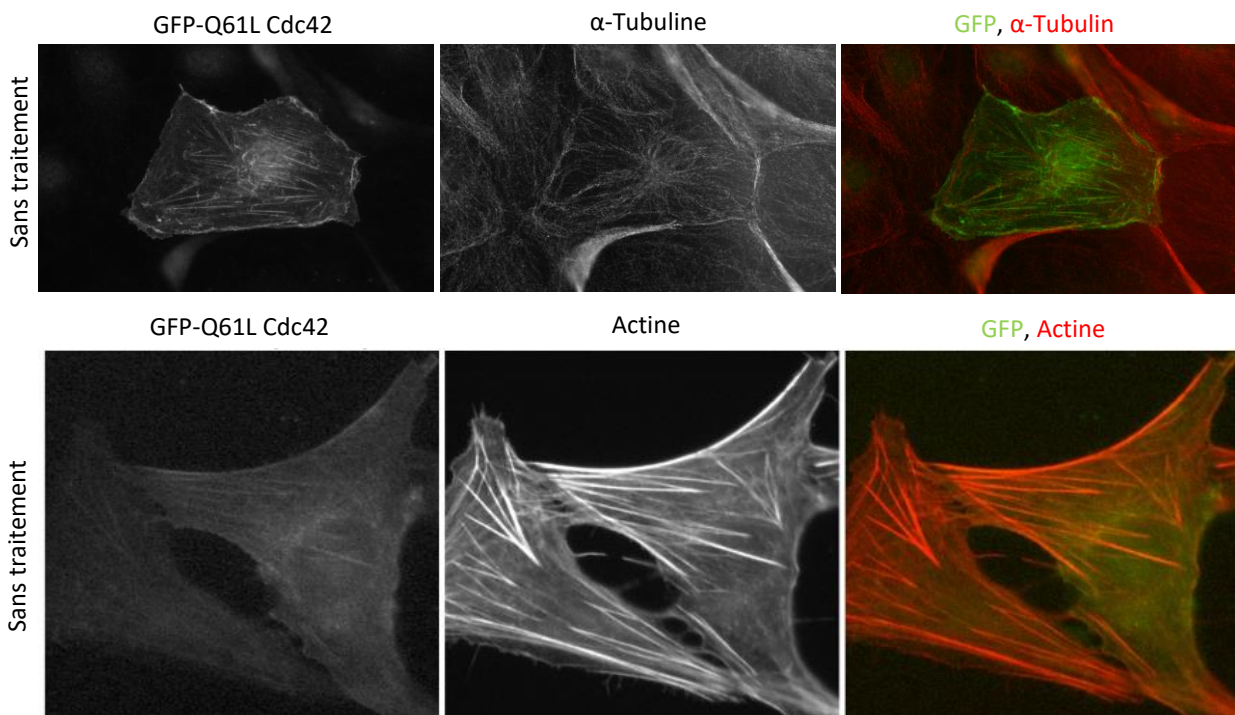
cellules au traitement par le paclitaxel. Puisque les MDA-MB 231 résistantes au paclitaxel possèdent moins de BORG2 que la lignée sensible, il serait intéressant de voir si la surexpression de BORG2 est aussi capable de rétablir la sensibilité de la lignée. Il serait intéressant d'évaluer aussi le niveau d'expression des autres protéines BORGs dans cette lignée ainsi que dans d'autres lignées cancéreuses résistantes au paclitaxel.

Puisque les protéines BORGs sont effectrices de Cdc42, nous avons exploré l'effet du traitement aigu par le paclitaxel sur cette Rho GTPase. Dans les HHL16, nous retrouvons que le paclitaxel diminue modérément l'activité de Cdc42, comme déjà proposé auparavant avec ce taxane (Cadamuro et al., 2016) ainsi qu'avec le docétaxel et l'épothilone B (Bijman et al., 2006). Le mécanisme qui fait que le paclitaxel agit sur Cdc42 n'est pas connu. Il se peut qu'il induise des changements conformationnels de la protéine limitant ainsi son activité comme cela a récemment été découvert pour plusieurs protéines mitochondriales et du cytosquelette (Chavez et al., 2019). Le paclitaxel pourrait également agir en amont sur des GEFs de Cdc42, ou bien en aval sur des GAPs. L'inactivation de Cdc42 mesurée par le kit G-LISA® (Article 2, figure 6D) montre que le paclitaxel induit une faible diminution de l'activité de Cdc42 mais qui semble suffire pour déclencher la relocalisation des septines vers les MTs. Une explication possible est que l'inhibition de Cdc42 pourrait être localement plus forte au niveau des fibres de stress mais que cet effet local serait dilué dans le cas d'une mesure cellulaire globale. Il se peut que l'effet que le paclitaxel a sur BORG2 passe également par d'autres voies de signalisation : Les protéines BORGs sont régulées par TC10/RhoQ et RhoA d'une façon pas encore claire (Joberty et al., 1999), ainsi que par la PKC (Zhao and Rotenberg, 2014) et ERK2 (Carlson et al., 2011).

Une inactivation de Cdc42 a déjà été démontrée comme inhibitrice de BORG5 (Burbelo et al., 1999), des BORG1-4 (Hirsch et al., 2001) dans les cellules NIH 3T3 et de BORG2 dans les CAFs, menant à la perte des filaments de septines et des fibres de stress (Farrugia and Calvo, 2017). L'inhibition de Cdc42 par un inhibiteur chimique spécifique ML141 (Surviladze et al., 2010) induit la dégradation de BORG2 dans les cellules HHL16 et la relocalisation des filaments de septines vers les MTs. Ce phénotype est particulier à Cdc42 puisque l'inhibition de Rac1 par son inhibiteur spécifique 1A-116 n'a pas le même effet. Cependant, l'expression de la forme dominante négative de Cdc42 (T17N) n'affecte pas significativement le niveau de BORG2 dans la cellule malgré le fait que certaines expérimentations (présentées par des points sur le

graphique de la Fig. 7A de la deuxième partie de la thèse) montraient une diminution de ce dernier. L'activation de Cdc42 permet de maintenir plus de BORG2 dans la cellule en présence de paclitaxel, que ce soit par l'activation du Cdc42 endogène par une courte exposition au TNF $\alpha$  (Puls et al., 1999) ou par une expression d'une forme constitutivement active de Cdc42 (Q61L). Une détection des différentes isoformes de BORG2 ou l'identification des modifications post-traductionnelles de cette protéine nous permettrait de déterminer s'il existe une isoforme active ou une modification post-traductionnelle activatrice.

La forme constitutivement active de Cdc42 a été détectée dans différents types cellulaires comme diffuse dans le cytoplasme (Nalbant et al., 2004 ; Gao et al., 2013) et au niveau de la membrane plasmique mais de façon intéressante, 18% des HHL16 transfectées par le plasmide de la forme active de Cdc42 (Q61L) présentait la protéine surexprimée visible sur les fibres de stress (**Figure 50**).

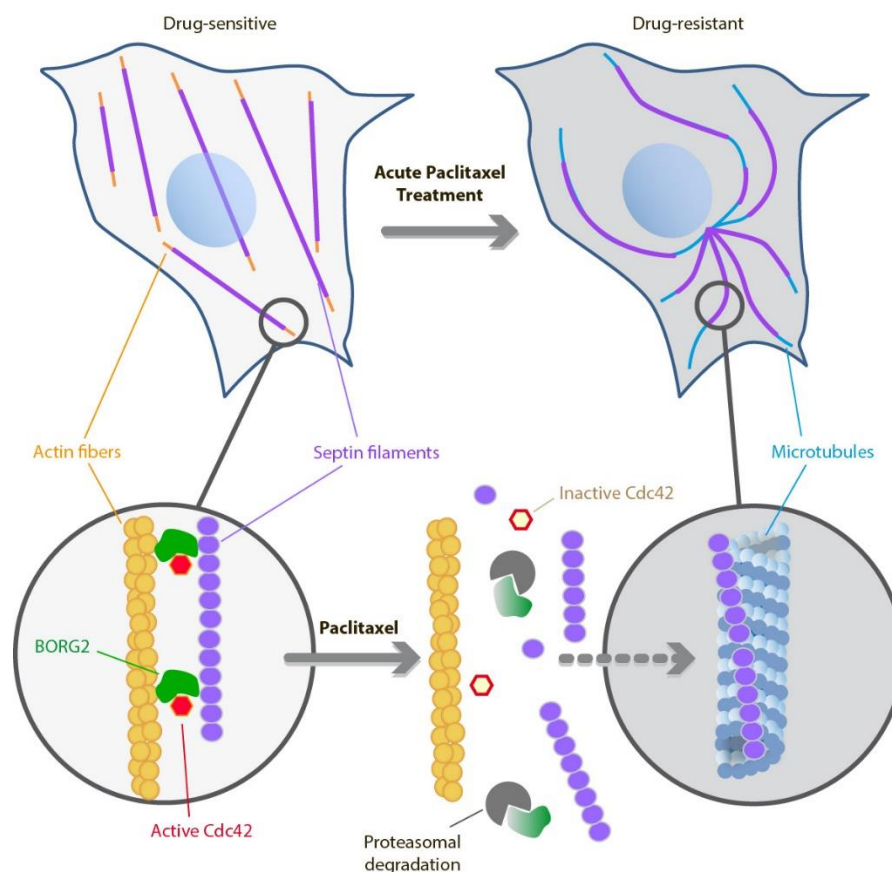


**Figure 50: Fluorescence émise par le GFP de Cdc42-Q61L suggérant la présence de la forme active de Cdc42 sur les fibres de stress**

Ces mêmes cellules conservent les septines sur l'actine même après un traitement par du paclitaxel, un phénotype préalablement observé en surexprimant BORG2. Ce n'est pas la première fois que les septines sont retrouvées localisées au même endroit que Cdc42. En effet, dans les spermatozoïdes de souris, Cdc42 et SEPT12 colocalisent (Huang et al., 2018). De plus, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les formes actives (Sadian et al., 2013) et inactives (Okada et al., 2013) de Cdc42 régulent le recrutement des septines au niveau du site de bourgeonnement. Dans nos expériences, contrairement au Q61L, le T17N ne présentait pas de localisation particulière dans les cellules, mais induisait la relocalisation des septines vers les MTs dans 30% de la population cellulaire.

Dans la littérature, il n'a jamais été montré que la forme constitutivement active de Cdc42 pouvait potentialiser l'effet des BORGs. Il a été décrit au contraire, qu'elle affecte négativement ces protéines : elle change la conformation de BORG3 cachant son domaine BH3 et par conséquent inhibe sa liaison aux septines (Joberty et al., 2001), ou bien accumule BORG2 dans des patches là où elle se trouve (Farrugia and Calvo, 2017). De plus, elle affecte négativement la polymérisation des filaments de septines : Dans le spermatozoïde de souris, la forme constitutivement active de Cdc42 diminue la forme polymérisée circulaire des septines et favorise la formation de spots de septines (Huang et al., 2018). En inhibant la liaison des protéines BORGs aux septines, la forme constitutivement active de Cdc42 empêche leur polymérisation (Joberty et al., 2001) ; (Sheffield et al., 2003). Contrairement à ce qui a été précédemment proposé, nos résultats montrent l'importance de l'activité de Cdc42 dans le maintien d'un niveau suffisant de BORG2 dans la cellule afin d'éviter la relocalisation subcellulaire des septines de l'actine vers les MTs suite à un traitement par le paclitaxel et l'initiation d'une résistance aux taxanes.

Cette partie de la thèse montre donc que lors d'une exposition de courte durée au paclitaxel, l'inhibition de Cdc42 initie la dégradation protéosomale de BORG2 et la libération des filaments de septines des fibres d'actine, rendant leur relocalisation le long des MTs possible. BORG2 apparaît ainsi comme un acteur crucial dans la localisation subcellulaire des filaments de septines (**Figure 51**).



**Figure 51: Mécanisme de relocalisation des septines sur les microtubules à l'origine d'une résistance en réponse à un traitement aigu par du paclitaxel dans les HHL16**

(Salameh et al., en révision)

La relevance clinique éventuelle de BORG2 dans le contrôle de l'initiation de mécanismes de résistance aiguë aux taxanes reste totalement à démontrer. Il n'y a aujourd'hui à ma connaissance pas de travaux ayant montré de variation d'expression des BORG dans les cancers chez des patients. Les informations contenues dans des bases de données comme le protein atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000163171-CDC42EP3>) indiquent qu'il s'agit d'une protéine parfois surexprimée dans de nombreux types de cancers, mais sans valeur pronostique. D'après nos travaux réalisés sur des modèles cellulaires, il apparaît que le maintien d'un niveau cellulaire de BORG2 suffisant pourrait limiter la relocalisation des septines vers les MTs. Néanmoins, un niveau élevé de BORG2 a déjà été rendu responsable de l'augmentation de la contractilité et des capacités migratoires de fibroblastes associés aux tumeurs, qui sont alors capables d'entraîner dans leur migration des cellules cancéreuses (Calvo et al., 2015). Cependant, nous avons clairement montré que l'inhibition de l'expression



de cette protéine, en induisant la relocalisation des septines de l'actine vers les MTs, peut être à l'origine d'une résistance dans le cas d'un traitement par du paclitaxel. Il est donc peu probable que manipuler le niveau d'expression de BORG2 soit pertinent à explorer chez les patients et soit un levier exploitable pour améliorer les effets thérapeutiques des taxanes.

Des études précédentes ont montré qu'après dépolymérisation de l'actine, les septines formaient des anneaux dans le cytoplasme (Kinoshita et al., 2002 ; Joo et al., 2007). Dans nos conditions c'est-à-dire suite à un traitement par du paclitaxel, bien qu'elles ne puissent plus se lier à l'actine, les septines ne forment pas d'anneaux mais sont relocalisées vers les MTs. Nous nous sommes donc intéressés, dans la troisième partie de ma thèse, au rôle des MTs dans la formation des filaments de septines et dans leur acheminement à leur localisation finale, l'actine.

Il a été proposé que les oligomères de septines pouvaient former des filaments en s'associant à l'actine via des protéines adaptatrices (Kinoshita et al., 2002). Ils peuvent aussi s'associer à la membrane plasmique, reconstituée *in vitro*, par affinité au PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) et former des filaments par un mécanisme d'« annealing » (Bridges et al., 2014). Cependant, le rôle des MTs dans la formation des filaments de septines est peu exploré malgré le fait que les septines peuvent s'associer aux MTs sans traitement particulier dans certaines lignées cellulaires, telles que les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (Spiliotis et al., 2008) et les cellules HeLa (Hanai et al., 2004).

Afin de mieux étudier l'implication des MTs dans la formation des filaments de septines, nous avons procédé à la dépolymérisation des MTs par l'action du nocodazole, du froid ou la combinaison des deux, dans deux lignées cellulaires, HHL16 et RPE-1. Nous avons observé que l'absence de MTs s'accompagnait de la perte totale des oligomères ou filaments de septines, alors même que les fibres de stress étaient toujours présentes. Ce phénotype est retrouvé dans la totalité de la population des RPE-1 et dans  $74.0 \pm 1.8\%$  de celle des HHL16.

Il a été montré précédemment que les filaments de septines coalignés avec les MTs se désassemblaient après dépolymérisation de ces derniers par le nocodazole (Surka et al., 2002 ; Nagata et al., 2003 ; Martínez et al., 2006). En plus du fait que la dépolymérisation des MTs provoque aussi la disparition des filaments de septines alors qu'ils sont associés aux fibres de

stress dans les HHL16 et les RPE-1, les filaments de septines qui se reforment en parallèle de la repolymérisation de l'actine coalignent partiellement avec les MTs à des temps courts de lavage de cytochalasine B (Article 3, Figure 4). Bien que la survenue de ces alignements diffère entre les deux types cellulaires que nous avons étudiés, ils restent cependant minoritaires. Nous ne savons pas à quel point ils représentent un état intermédiaire de localisation transitoire des septines en route vers les filaments d'actine. En parallèle, d'autres filaments sont coalignés avec les fibres de stress et d'autres encore semblent ne s'associer ni aux MTs, ni à des fibres d'actine facilement identifiables. Ces résultats mettent en avant le rôle des MTs dans la formation des filaments de septines et leur présence sur l'actine, mais n'orientent que faiblement la réflexion sur les mécanismes mis en jeu.

Nous avons émis l'hypothèse que l'implication des MTs dans l'adressage des septines à l'actine pouvait avoir lieu par un transport MT-dépendant (**Figure 52**) des hétéro-oligomères ou des septines libres vers la membrane plasmique où s'effectue « l'annealing » comme dans le cas du champignon *Ustilago Maydis* (Zander et al., 2016). Chez ce champignon filamenteux, le trafic des oligomères de septines vers la membrane plasmique emprunte des vésicules Rab5-positives. Nous avons donc cherché à savoir si, par analogie, le trafic des endosomes précoces et/ou des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique pouvait modifier l'adressage des septines aux fibres de stress. De multiples moteurs de la famille des kinésines sont potentiellement impliqués dans la dynamique de ces endosomes (Granger et al., 2014) et nous n'avons exploré qu'une partie des possibilités. Les résultats obtenus avec l'inhibition des kinésines restent à étoffer et à harmoniser. A l'état basal, l'inhibition de la kinésine-1 KIF5B comme celle la kinésine-2 KIF3A n'induisent aucun phénotype particulier les septines, qui restent associées aux fibres de stress (B. Targa, données non publiées pour KIF5B). Cependant, nous avons essayé d'analyser la localisation des filaments de septines dans des cellules soumises à une reconstruction lente du réseau de MTs (après lavage du nocodazole et recroissance contrainte par une faible concentration de nocodazole résiduelle). Dans ces conditions, nous pensions ralentir la relocalisation des septines sur les fibres de stress et peut-être observer leur localisation intermédiaire sur des MTs qui sont par ailleurs résistants au nocodazole et présentent des caractéristiques de MTs stables (Marceiller et al., 2005). Lorsque ces expériences sont pratiquées dans des cellules RPE-1, l'inhibition de KIF5B retarde de façon très nette l'acheminement des septines sur les fibres de stress. Les septines forment

alors des filaments qui ne sont pas non plus associés aux MTs, mais probablement à des filaments d'actine sous-membranaires (ce qui reste cependant à démontrer). Au vu de ces résultats, il semble maintenant nécessaire de refaire des expériences d'inhibition de KIF3A dans des conditions similaires, et d'élargir aussi l'analyse aux effets d'une inhibition d'autres moteurs impliqués dans l'adressage à la membrane plasmique comme la kinésine-3 KIF13A qui intervient plus spécifiquement dans le transport des endosomes de recyclage (Delevoye et al., 2014). Certaines kinésines comme KIF5B semblent donc bien être impliquées dans l'adressage de septines à la membrane plasmique. Il est par conséquent possible d'envisager que les septines soient véhiculées par des transporteurs membranaires mais aussi en interagissant directement avec le moteur. Des études précédentes ont en effet montré que des interactions directes pouvaient exister entre septines et kinésines. C'est le cas en mitose entre la kinésine-7 CENP-E qui est associée aux kinétochores et SEPT2 (Spiliotis et al., 2005) et cette même kinésine et SEPT7 (Zhu et al., 2008). Aussi, les septines étant impliquées dans la formation d'une barrière moléculaire contrôlant l'accès au cil primaire, une interaction directe entre SEPT9 et la kinésine-2 KIF17 a déjà été démontrée (Bai et al., 2016). KIF-17 est impliquée dans le transport intraflagellaire mais aussi dans le trafic antérograde dans les dendrites (Reilly and Benmerah, 2019). Bien qu'elle semble plus impliquée dans le transport de MTs pré-assemblés, il serait aussi potentiellement intéressant d'inhiber cette kinésine et d'évaluer l'effet de son inhibition sur la localisation des septines. La nature du cargo transporté vers la membrane plasmique par une kinésine sur les MTs reste néanmoins à définir. Il peut s'agir de septines mais également de facteurs autres, comme des phosphoinositides ou des protéines/enzymes, impliqués dans une association renforcée des septines à la membrane plasmique pour la formation de longs filaments de septines ou leur livraison sur les fibres de stress.

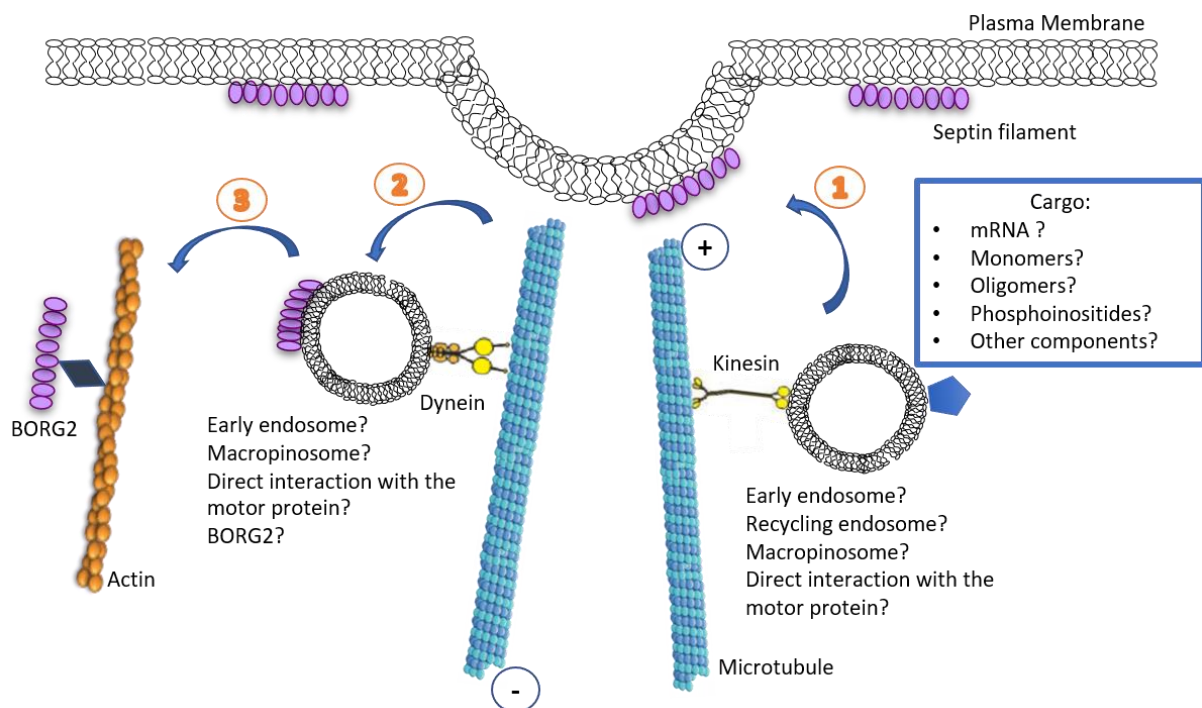
A l'opposé du trafic médié par les kinésines, la perturbation de l'activité de la dynéine, responsable d'un trafic orienté vers l'extrémité moins des MTs induit clairement une relocalisation importante des septines vers les MTs dans les HHL16, suggérant que le trafic de vésicules d'endocytose/d'endosomes précoces est important pour la localisation MT-dépendante des septines sur les fibres de stress. Dans les MDA-MB 231 rendues résistantes au paclitaxel, nous avons trouvé une baisse importante de l'accumulation de la dynéine dans les extraits totaux (Froidevaux-Klipfel et al., 2011). Cette baisse pourrait être due à

l'inactivation de la dynéine par le paclitaxel, ou bien à l'effet que le paclitaxel a sur la conformation des tubulines induisant ainsi le détachement de la dynéine du MT (Chavez et al., 2019). Nos résultats montrant que la perturbation d'un transport dynéine dépendant résulte en une association des septines avec les MTs, il serait intéressant de voir si la surexpression ou l'activation de la dynéine dans les MDA-MB 231 rendues résistantes permettrait de maintenir les septines sur l'actine. Une telle activation pourrait s'effectuer par la surexpression de protéines adaptatrices capables de recruter la dynéine sur des vésicules ou des organites différents, comme les protéines Hook ou les complexes Rab11-FIP3 pour les endosomes ou encore les protéines BICD pour le Golgi (Olenick and Holzbaur, 2019). A ce stade, il est très difficile de savoir si la dynéine transporte des septines directement ou par l'intermédiaire de transporteurs membranaires, ou même si ce transport amène les septines de la membrane plasmique vers les fibres de stress puisqu'aucune étape intermédiaire n'a pour l'instant pu être observée, où les septines resteraient bloquées à la membrane plasmique. L'hypothèse que la dynéine transporte les septines directement est plausible car une étude protéomique analysant l'interactome de la dynéine montre que les septines font partie des protéines interagissant avec ce moteur (Redwine et al., 2017). En particulier, il a été montré que SEPT9 interagit avec la dynéine et est nécessaire pour le bon fonctionnement de ce moteur (Kesisova et al., 2020). Alternativement, on peut imaginer que la dynéine décroche les septines des MTs pour qu'elles soient ensuite secondairement localisées sur les fibres d'actine. Pour répondre à cette question, on pourrait exprimer une septine fusionnée à une protéine autofluorescente photoconvertible monomérique de type Dendra2. La photoconversion (du vert au rouge sous l'effet d'une excitation par une raie laser à 405nm) pourrait être réalisée localement à la membrane plasmique ou dans une zone dépourvue de fibres de stress. En combinant avec l'inhibition de la dynéine, on aurait une chance de voir si les septines doivent passer par les MTs pour rejoindre les fibres de stress.

Par ailleurs, le knockdown de Rab5 n'induit pas non plus d'effet sur la localisation subcellulaire des septines, mais cela n'exclut pas que les septines puissent être transportées par des endosomes précoces car d'autres Rab peuvent prendre le relais, comme Rab4 ou Rab21 (Pour revue : (Hutagalung and Novick, 2011). Une inhibition de Rab7, connue pour localiser avec les septines (Dolat and Spiliotis, 2016), n'induit pas non plus dans nos cellules de modifications de la localisation subcellulaire des septines, de même qu'une expérience préliminaire

d'inhibition de Rab35 (données non montrées). Il serait peut-être intéressant d'inhiber l'expression de plusieurs Rabs en même temps pour exclure définitivement l'idée du transport des septines par des endosomes.

L'identification de la nature de la cargaison transportée par la dynéine est importante. Il faudrait donc pouvoir visualiser les septines colocalisées avec ces cargaisons, en absence et en présence de paclitaxel. Jusqu'à présent les candidats potentiels sont les endosomes précoces AP-3 positifs (Traikov et al., 2014), les endosomes de recyclage Rab35 positifs (Kouranti et al., 2006) ou les macropinosomes (Dolat and Spiliotis, 2016). Il faudrait aussi évaluer si des échanges de cargaison entre la dynéine et certaines myosines peuvent avoir lieu suite à un traitement par le paclitaxel. Une étude a montré un échange de granules de pigment entre MTs et actine, plus particulièrement le passage, régulé par la protéine kinase A, d'une motorisation par la dynéine à une prise en charge par la myosine V (Rodionov et al., 2003). Le transport des septines par des moteurs moléculaires interagissant avec l'actine et les MTs tels que CHO1/MKLP1/KIF23 (Kuriyama et al., 2002) pourrait aussi être exploré.



**Figure 52: Mécanisme hypothétique de l'implication des microtubules dans la formation des filaments de septines et leur livraison aux fibres de stress**

Même si bien des points restent à élucider, le travail de ma thèse a permis de mettre en avant différents acteurs dans le dialogue entre les MTs, les microfilaments d'actine et les septines

en réponse au paclitaxel (première et deuxième partie de la thèse) ainsi qu'en conditions basales (troisième partie de la thèse). Du point de vue thérapeutique, bloquer la relocalisation des septines de l'actine vers les MTs semble judicieux pour éviter la résistance aux traitements par les taxanes. Cependant, atteindre cet objectif en maintenant une forte expression de BORG2 par inhibition de sa dégradation peut aussi avoir un effet promoteur de la progression tumorale, donc il est possible qu'une telle approche ne présente aucun bénéfice. De même, l'inhibition de l'expression SEPT9\_i1, l'isoforme nécessaire pour la relocalisation des septines a peu de chances d'aboutir car des données très récentes montrent qu'elle est nécessaire pour le bon fonctionnement de la dynéine et pour la localisation centrale de multiples organites (Kesisova et al., 2020). Par conséquent, la compréhension du mécanisme de localisation subcellulaire des septines et de relocalisation en réponse au paclitaxel reste encore à approfondir, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

## Bibliographie

- Ageta-Ishihara, N., T. Miyata, C. Ohshima, M. Watanabe, Y. Sato, Y. Hamamura, T. Higashiyama, R. Mazitschek, H. Bito, and M. Kinoshita. 2013a. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. *Nat Commun.* 4:2532. doi:10.1038/ncomms3532.
- Ageta-Ishihara, N., H. Yamakado, T. Morita, S. Hattori, K. Takao, T. Miyakawa, R. Takahashi, and M. Kinoshita. 2013b. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol Brain.* 6:35. doi:10.1186/1756-6606-6-35.
- Ageta-Ishihara, N., M. Yamazaki, K. Konno, H. Nakayama, M. Abe, K. Hashimoto, T. Nishioka, K. Kaibuchi, S. Hattori, T. Miyakawa, K. Tanaka, F. Huda, H. Hirai, K. Hashimoto, M. Watanabe, K. Sakimura, and M. Kinoshita. 2015. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. *Nat Commun.* 6:10090. doi:10.1038/ncomms10090.
- Aillaud, C., C. Bosc, L. Peris, A. Bosson, P. Heemeryck, J. Van Dijk, J. Le Fric, B. Boulan, F. Vossier, L.E. Sanman, S. Syed, N. Amara, Y. Couté, L. Lafanechère, E. Denarier, C. Delphin, L. Pelletier, S. Humbert, M. Bogyo, A. Andrieux, K. Rogowski, and M.-J. Moutin. 2017. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science.* 358:1448–1453. doi:10.1126/science.aao4165.
- Ajabnoor, G.M.A., T. Crook, and H.M. Coley. 2012. Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 3:e260. doi:10.1038/cddis.2011.139.
- Akella, J.S., D. Wloga, J. Kim, N.G. Starostina, S. Lyons-Abbott, N.S. Morrisette, S.T. Dougan, E.T. Kipreos, and J. Gaertig. 2010. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature.* 467:218–222. doi:10.1038/nature09324.
- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 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.
- Akhtar, J., Z. Wang, W.P. Jiang, M.M. Bi, and Z.P. Zhang. 2014. Stathmin overexpression identifies high risk for lymphatic metastatic recurrence in pN0 esophageal squamous cell carcinoma patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29:944–950. doi:10.1111/jgh.12498.
- Al-Bassam, J., H. Kim, G. Brouhard, A. van Oijen, S.C. Harrison, and F. Chang. 2010. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev. Cell.* 19:245–258. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.016.
- Alexander, J.E., D.F. Hunt, M.K. Lee, J. Shabanowitz, H. Michel, S.C. Berlin, T.L. MacDonald, R.J. Sundberg, L.I. Rebhun, and A. Frankfurter. 1991. Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 88:4685–4689. doi:10.1073/pnas.88.11.4685.
- Alexandre, J., Y. Hu, W. Lu, H. Pelicano, and P. Huang. 2007. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 67:3512–3517. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3914.

- Alli, E., J. Bash-Babula, J.-M. Yang, and W.N. Hait. 2002. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. *Cancer Res.* 62:6864–6869.
- de Almeida Marques, I., N.F. Valadares, W. Garcia, J.C.P. Damalio, J.N.A. Macedo, A.P.U. de Araújo, C.A. Botello, J.M. Andreu, and R.C. Garratt. 2012. Septin C-terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. *Cell Biochem. Biophys.* 62:317–328. doi:10.1007/s12013-011-9307-0.
- Alonso, A., M. Greenlee, J. Matts, J. Kline, K.J. Davis, and R.K. Miller. 2015. Emerging roles of sumoylation in the regulation of actin, microtubules, intermediate filaments, and septins. *Cytoskeleton (Hoboken).* 72:305–339. doi:10.1002/cm.21226.
- Alushin, G.M., G.C. Lander, E.H. Kellogg, R. Zhang, D. Baker, and E. Nogales. 2014. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in  $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell.* 157:1117–1129. doi:10.1016/j.cell.2014.03.053.
- Amir, S., M. Golan, and N.J. Mabeesh. 2010. Targeted Knockdown of SEPT9\_v1 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis of Human Prostate Cancer Cells Concomitant with Disruption of Hypoxia-Inducible Factor-1 Pathway. *Mol Cancer Res.* 8:643–652. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0497.
- Amir, S., and N.J. Mabeesh. 2007. SEPT9\_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule-disrupting agents. *Cancer Biol. Ther.* 6:1926–1931. doi:10.4161/cbt.6.12.4971.
- Amir, S., R. Wang, H. Matzkin, J.W. Simons, and N.J. Mabeesh. 2006. MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis. *Cancer Res.* 66:856–866. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2738.
- Amir, S., R. Wang, J.W. Simons, and N.J. Mabeesh. 2009. SEPT9\_v1 Up-regulates Hypoxia-inducible Factor 1 by Preventing Its RACK1-mediated Degradation. *J. Biol. Chem.* 284:11142–11151. doi:10.1074/jbc.M808348200.
- Amos, L.A. 2004. Microtubule structure and its stabilisation. *Org. Biomol. Chem.* 2:2153. doi:10.1039/b403634d.
- Arakawa, Y., J.V. Cordeiro, S. Schleich, T.P. Newsome, and M. Way. 2007. The release of vaccinia virus from infected cells requires RhoA-mediated modulation of cortical actin. *Cell Host Microbe.* 1:227–240. doi:10.1016/j.chom.2007.04.006.
- Arce, C.A., J.A. Rodriguez, H.S. Barra, and R. Caputto. 1975. Incorporation of L-Tyrosine, L-Phenylalanine and L-3,4-Dihydroxyphenylalanine as Single Units into Rat Brain Tubulin. *Eur J Biochem.* 59:145–149. doi:10.1111/j.1432-1033.1975.tb02435.x.
- Arellano-Santoyo, H., E.A. Geyer, E. Stokasimov, G.-Y. Chen, X. Su, W. Hancock, L.M. Rice, and D. Pellman. 2017. A Tubulin Binding Switch Underlies Kip3/Kinesin-8 Depolymerase Activity. *Dev Cell.* 42:37–51.e8. doi:10.1016/j.devcel.2017.06.011.
- Armijo-Weingart, L., and G. Gallo. 2017. It takes a village to raise a branch: Cellular mechanisms of the initiation of axon collateral branches. *Mol Cell Neurosci.* 84:36–47. doi:10.1016/j.mcn.2017.03.007.



- Arnal, I., C. Heichette, G.S. Diamantopoulos, and D. Chrétien. 2004. CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol.* 14:2086–2095. doi:10.1016/j.cub.2004.11.055.
- Arnold, J., J. Schattschneider, C. Blechner, C. Krisp, H. Schlüter, M. Schweizer, M. Nalaskowski, L. Oliveira-Ferrer, and S. Windhorst. 2020. Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTL4) overexpression in breast cancer cells is associated with brain metastasis and alters exosome biogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 39:205. doi:10.1186/s13046-020-01712-w.
- Arpağ, G., E.J. Lawrence, V.J. Farmer, S.L. Hall, and M. Zanic. 2020. Collective effects of XMAP215, EB1, CLASP2, and MCAK lead to robust microtubule treadmilling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 117:12847–12855. doi:10.1073/pnas.2003191117.
- Attia, S.M. 2013. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of genotoxic potential of amsacrine and nocodazole in mouse bone marrow cells. *J Appl Toxicol.* 33:426–433. doi:10.1002/jat.1753.
- Aumeier, C., L. Schaedel, J. Gaillard, K. John, L. Blanchoin, and M. Théry. 2016. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat Cell Biol.* 18:1054–1064. doi:10.1038/ncb3406.
- Austin, T.O., A.J. Matamoros, J.M. Friedman, A.J. Friedman, P. Nacharaju, W. Yu, D.J. Sharp, and P.W. Baas. 2017. Nanoparticle Delivery of Fidgetin siRNA as a Microtubule-based Therapy to Augment Nerve Regeneration. *Sci Rep.* 7:9675. doi:10.1038/s41598-017-10250-z.
- Bacus, S.S., A.V. Gudkov, M. Lowe, L. Lyass, Y. Yung, A.P. Komarov, K. Keyomarsi, Y. Yarden, and R. Seger. 2001. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene.* 20:147–155. doi:10.1038/sj.onc.1204062.
- Bahou, W.F., A.D. Campbell, and M.S. Wicha. 1992. cDNA cloning and molecular characterization of MSE55, a novel human serum constituent protein that displays bone marrow stromal/endothelial cell-specific expression. *J. Biol. Chem.* 267:13986–13992.
- Bai, X., J.R. Bowen, T.K. Knox, K. Zhou, M. Pendziwiat, G. Kuhlenbäumer, C.V. Sindelar, and E.T. Spiliotis. 2013. Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J. Cell Biol.* 203:895–905. doi:10.1083/jcb.201308068.
- Bai, X., E.P. Karasmanis, and E.T. Spiliotis. 2016. Septin 9 interacts with kinesin KIF17 and interferes with the mechanism of NMDA receptor cargo binding and transport. *Mol Biol Cell.* 27:897–906. doi:10.1091/mbc.E15-07-0493.
- Bannykh, S.I., T. Rowe, and W.E. Balch. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol.* 135:19–35. doi:10.1083/jcb.135.1.19.
- Barlan, K., W. Lu, and V.I. Gelfand. 2013. The microtubule-binding protein ensconsin is an essential cofactor of kinesin-1. *Curr Biol.* 23:317–322. doi:10.1016/j.cub.2013.01.008.
- Bashour, A.M., A.T. Fullerton, M.J. Hart, and G.S. Bloom. 1997. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J Cell Biol.* 137:1555–1566. doi:10.1083/jcb.137.7.1555.
- Basnet, N., H. Nedožralova, A.H. Crevenna, S. Bodakuntla, T. Schlichthaerle, M. Taschner, G. Cardone, C. Janke, R. Jungmann, M.M. Magiera, C. Biertümpfel, and N. Mizuno. 2018. Direct induction

- of microtubule branching by microtubule nucleation factor SSNA1. *Nat Cell Biol.* 20:1172–1180. doi:10.1038/s41556-018-0199-8.
- Batsaikhan, B.-E., K. Yoshikawa, N. Kurita, T. Iwata, C. Takasu, H. Kashihara, and M. Shimada. 2014. Expression of Stathmin1 in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 34:4217–4221.
- Beber, A., C. Taveneau, M. Nania, F.-C. Tsai, A. Di Cicco, P. Bassereau, D. Lévy, J.T. Cabral, H. Isambert, S. Mangenot, and A. Bertin. 2019. Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments. *Nat Commun.* 10:420. doi:10.1038/s41467-019-08344-5.
- Beites, C.L., K.A. Campbell, and W.S. Trimble. 2005. The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem J.* 385:347–353. doi:10.1042/BJ20041090.
- Bender, J., J. Fang, and R. Simon. 2017. A computational study of the inhibition mechanisms of P-glycoprotein mediated paclitaxel efflux by kinase inhibitors. *BMC Syst Biol.* 11:108. doi:10.1186/s12918-017-0498-x.
- Ben-Hamo, R., A. Zilberberg, H. Cohen, K. Bahar-Shany, C. Wachtel, J. Korach, S. Aviel-Ronen, I. Barshack, D. Barash, K. Levanon, and S. Efroni. 2019. Resistance to paclitaxel is associated with a variant of the gene BCL2 in multiple tumor types. *npj Precis. Onc.* 3:12. doi:10.1038/s41698-019-0084-3.
- Bertin, A., M.A. McMurray, J. Pierson, L. Thai, K.L. McDonald, E.A. Zehr, G. García, P. Peters, J. Thorner, and E. Nogales. 2012. Three-dimensional ultrastructure of the septin filament network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 23:423–432. doi:10.1091/mbc.E11-10-0850.
- Bertin, A., M.A. McMurray, L. Thai, G. Garcia, V. Votin, P. Grob, T. Allyn, J. Thorner, and E. Nogales. 2010. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J. Mol. Biol.* 404:711–731. doi:10.1016/j.jmb.2010.10.002.
- Biaoxue, R., C. Xiguang, L. Hua, and Y. Shuanying. 2016. Stathmin-dependent molecular targeting therapy for malignant tumor: the latest 5 years' discoveries and developments. *J Transl Med.* 14:279. doi:10.1186/s12967-016-1000-z.
- Bieling, P., I.A. Telley, and T. Surrey. 2010. A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell.* 142:420–432. doi:10.1016/j.cell.2010.06.033.
- Bijman, M.N.A., G.P. van Nieuw Amerongen, N. Laurens, V.W.M. van Hinsbergh, and E. Boven. 2006. Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. *Mol. Cancer Ther.* 5:2348–2357. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0242.
- van Binsbergen, E., O. de Weerd, and A. Buijs. 2007. A new subtype of MLL-SEPT2 fusion transcript in therapy-related acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23): a case report and literature review. *Cancer Genet. Cytogenet.* 176:72–75. doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.04.001.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 1998. Interaction of Actin Monomers with *Acanthamoeba* Actophorin (ADF/Cofilin) and Profilin. *J. Biol. Chem.* 273:25106–25111. doi:10.1074/jbc.273.39.25106.

- Blanchoin, L., T.D. Pollard, and R.D. Mullins. 2000. Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Current Biology*. 10:1273–1282. doi:10.1016/S0960-9822(00)00749-1.
- Block, J., D. Breitsprecher, S. Kühn, M. Winterhoff, F. Kage, R. Geffers, P. Duwe, J.L. Rohn, B. Baum, C. Brakebusch, M. Geyer, T.E.B. Stradal, J. Faix, and K. Rottner. 2012. FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* 22:1005–1012. doi:10.1016/j.cub.2012.03.064.
- Bodakuntla, S., A.S. Jijumon, C. Villablanca, C. Gonzalez-Billault, and C. Janke. 2019. Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*. 29:804–819. doi:10.1016/j.tcb.2019.07.004.
- Boehmerle, W., K. Zhang, M. Sivula, F.M. Heidrich, Y. Lee, S.-E. Jordt, and B.E. Ehrlich. 2007. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:11103–11108. doi:10.1073/pnas.0701546104.
- Bollag, D.M., P.A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, and C.M. Woods. 1995. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* 55:2325–2333.
- Booth, E.A., S.M. Sterling, D. Dovala, E. Nogales, and J. Thorner. 2016. Effects of Bni5 Binding on Septin Filament Organization. *J. Mol. Biol.* 428:4962–4980. doi:10.1016/j.jmb.2016.10.024.
- Borkhardt, A., A. Teigler-Schlegel, U. Fuchs, C. Keller, M. König, J. Harbott, and O.A. Haas. 2001. An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2. *Genes Chromosomes Cancer*. 32:82–88. doi:10.1002/gcc.1169.
- Bosch Grau, M., C. Masson, S. Gadadhar, C. Rocha, O. Tort, P. Marques Sousa, S. Vacher, I. Bieche, and C. Janke. 2017. Alterations in the balance of tubulin glycylation and glutamylation in photoreceptors leads to retinal degeneration. *J Cell Sci.* 130:938–949. doi:10.1242/jcs.199091.
- Bowen, J.R., D. Hwang, X. Bai, D. Roy, and E.T. Spiliotis. 2011. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *J. Cell Biol.* 194:187–197. doi:10.1083/jcb.201102076.
- Braguer, D., J.-M. Barret, H. McDaid, and A. Kruczynski. 2008. Antitumor activity of vinflunine: effector pathways and potential for synergies. *Semin. Oncol.* 35:S13-21. doi:10.1053/j.seminoncol.2008.01.011.
- Brand, F., S. Schumacher, S. Kant, M.B. Menon, R. Simon, B. Turgeon, S. Britsch, S. Meloche, M. Gaestel, and A. Kotlyarov. 2012. The extracellular signal-regulated kinase 3 (mitogen-activated protein kinase 6 [MAPK6])-MAPK-activated protein kinase 5 signaling complex regulates septin function and dendrite morphology. *Mol. Cell. Biol.* 32:2467–2478. doi:10.1128/MCB.06633-11.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.

- Bretscher, A., and K. Weber. 1978. Purification of microvilli and an analysis of the protein components of the microfilament core bundle. *Exp Cell Res.* 116:397–407. doi:10.1016/0014-4827(78)90463-9.
- Bretscher, A., and K. Weber. 1979. Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:2321–2325. doi:10.1073/pnas.76.5.2321.
- Bretscher, A., and K. Weber. 1980. Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. *J Cell Biol.* 86:335–340. doi:10.1083/jcb.86.1.335.
- Bridges, A.A., and A.S. Gladfelter. 2015. Septin Form and Function at the Cell Cortex. *J Biol Chem.* 290:17173–17180. doi:10.1074/jbc.R114.634444.
- Bridges, A.A., M.S. Jentsch, P.W. Oakes, P. Occhipinti, and A.S. Gladfelter. 2016. Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology.* 213:23–32. doi:10.1083/jcb.201512029.
- Bridges, A.A., H. Zhang, S.B. Mehta, P. Occhipinti, T. Tani, and A.S. Gladfelter. 2014. Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:2146–2151. doi:10.1073/pnas.1314138111.
- Brodsky, F.M. 2016. Clathrin and Clathrin-Dependent Endocytosis. *In Encyclopedia of Cell Biology.* Elsevier. 384–393.
- Brouhard, G.J., and L.M. Rice. 2014. The contribution of  $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* 207:323–334. doi:10.1083/jcb.201407095.
- Brown, A.K., S.D. Hunt, and D.J. Stephens. 2014. Opposing microtubule motors control motility, morphology and cargo segregation during ER-to-Golgi transport. *Biol Open.* 3:307–313. doi:10.1242/bio.20147633.
- Burbelo, P.D., D. Drechsel, and A. Hall. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270:29071–29074. doi:10.1074/jbc.270.49.29071.
- Burbelo, P.D., D.M. Snow, W. Bahou, and S. Spiegel. 1999. MSE55, a Cdc42 effector protein, induces long cellular extensions in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:9083–9088. doi:10.1073/pnas.96.16.9083.
- Byers, B., and L. Goetsch. 1976. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J. Cell Biol.* 69:717–721. doi:10.1083/jcb.69.3.717.
- Cadamuro, M., G. Spagnuolo, L. Sambado, S. Indraccolo, G. Nardo, A. Rosato, S. Brivio, C. Caslini, T. Stecca, M. Massani, N. Bassi, E. Novelli, C. Spirli, L. Fabris, and M. Strazzabosco. 2016. Low-Dose Paclitaxel Reduces S100A4 Nuclear Import to Inhibit Invasion and Hematogenous Metastasis of Cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* 76:4775–4784. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0188.
- Calvo, F., R. Ranftl, S. Hooper, A.J. Farrugia, E. Moeendarbary, A. Bruckbauer, F. Batista, G. Charras, and E. Sahai. 2015. Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep.* 13:2699–2714. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.052.

- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:237–251. doi:10.1038/nrm2867.
- Cannon, K.S., B.L. Woods, J.M. Crutchley, and A.S. Gladfelter. 2019. An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. *J. Cell Biol.* 218:1128–1137. doi:10.1083/jcb.201807211.
- Carbonaro, M., A. O’Brate, and P. Giannakakou. 2011. Microtubule disruption targets HIF-1 $\alpha$  mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *Journal of Cell Biology.* 192:83–99. doi:10.1083/jcb.201004145.
- Carrier, M.F. 1982. Guanosine-5'-triphosphate hydrolysis and tubulin polymerization. Review article. *Mol. Cell. Biochem.* 47:97–113. doi:10.1007/BF00234410.
- Carlson, S.M., C.R. Chouinard, A. Labadorf, C.J. Lam, K. Schmelzle, E. Fraenkel, and F.M. White. 2011. Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3. *Sci Signal.* 4:rs11. doi:10.1126/scisignal.2002010.
- Caron, J.M. 1997. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *MBoC.* 8:621–636. doi:10.1091/mbc.8.4.621.
- Carr, J.R., H.J. Park, Z. Wang, M.M. Kiefer, and P. Raychaudhuri. 2010. FoxM1 mediates resistance to herceptin and paclitaxel. *Cancer Res.* 70:5054–5063. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0545.
- Casamayor, A., and M. Snyder. 2003. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol. Cell. Biol.* 23:2762–2777. doi:10.1128/mcb.23.8.2762-2777.2003.
- Caudron, F., and Y. Barral. 2009. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev Cell.* 16:493–506. doi:10.1016/j.devcel.2009.04.003.
- Caudron, F., E. Denarier, J.-C. Thibout-Quintana, J. Brocard, A. Andrieux, and A. Fourest-Lieuvin. 2010. Mutation of Ser172 in Yeast  $\beta$  Tubulin Induces Defects in Microtubule Dynamics and Cell Division. *PLoS ONE.* 5:e13553. doi:10.1371/journal.pone.0013553.
- Cauvin, C., M. Rosendale, N. Gupta-Rossi, M. Rocancourt, P. Larraufie, R. Salomon, D. Perrais, and A. Echard. 2016. Rab35 GTPase Triggers Switch-like Recruitment of the Lowe Syndrome Lipid Phosphatase OCRL on Newborn Endosomes. *Curr. Biol.* 26:120–128. doi:10.1016/j.cub.2015.11.040.
- Cerione, R.A., and Y. Zheng. 1996. The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:216–222. doi:10.1016/s0955-0674(96)80068-8.
- Cerveira, N., S. Bizarro, and M.R. Teixeira. 2011. MLL-SEPTIN gene fusions in hematological malignancies. *Biol. Chem.* 392:713–724. doi:10.1515/BC.2011.072.
- Cerveira, N., C. Correia, S. Bizarro, C. Pinto, S. Lisboa, J.M. Mariz, M. Marques, and M.R. Teixeira. 2006. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene.* 25:6147–6152. doi:10.1038/sj.onc.1209626.
- Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand, and C. Poüs. 2001. The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell.* 12:2047–2060. doi:10.1091/mbc.12.7.2047.

- Chacko, A.D., P.L. Hyland, S.S. McDade, P.W. Hamilton, S.H. Russell, and P.A. Hall. 2005. SEPT9\_v4 expression induces morphological change, increased motility and disturbed polarity. *J. Pathol.* 206:458–465. doi:10.1002/path.1794.
- Chacko, A.D., S.S. McDade, S. Chanduloy, S.W. Church, R. Kennedy, J. Price, P.A. Hall, and S.E.H. Russell. 2012. Expression of the SEPT9\_i4 isoform confers resistance to microtubule-interacting drugs. *Cell Oncol (Dordr)*. 35:85–93. doi:10.1007/s13402-011-0066-0.
- Chao, Y., W.K. Chan, M.J. Birkhofer, O.Y. Hu, S.S. Wang, Y.S. Huang, M. Liu, J. Whang-Peng, K.H. Chi, W.Y. Lui, and S.D. Lee. 1998. Phase II and pharmacokinetic study of paclitaxel therapy for unresectable hepatocellular carcinoma patients. *Br. J. Cancer*. 78:34–39. doi:10.1038/bjc.1998.438.
- Chavez, J.D., A. Keller, B. Zhou, R. Tian, and J.E. Bruce. 2019. Cellular Interactome Dynamics during Paclitaxel Treatment. *Cell Reports*. 29:2371-2383.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.063.
- Chen, G.-C., Y.-J. Kim, and C.S.M. Chan. 1997. The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*. 11:2958–2971. doi:10.1101/gad.11.22.2958.
- Chen, X., K. Wang, T. Svitkina, and E. Bi. 2020. Critical Roles of a RhoGEF-Anillin Module in Septin Architectural Remodeling during Cytokinesis. *Current Biology*. 30:1477-1490.e3. doi:10.1016/j.cub.2020.02.023.
- Chen, Y., P. Wang, and K.C. Slep. 2019. Mapping multivalency in the CLIP-170-EB1 microtubule plus-end complex. *J Biol Chem*. 294:918–931. doi:10.1074/jbc.RA118.006125.
- Chevallier, J., C. Koop, A. Srivastava, R.J. Petrie, N. Lamarche-Vane, and J.F. Presley. 2009. Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape. *FEBS Letters*. 583:1096–1101. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.012.
- Chih, B., P. Liu, Y. Chinn, C. Chalouni, L.G. Komuves, P.E. Hass, W. Sandoval, and A.S. Peterson. 2011. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat Cell Biol*. 14:61–72. doi:10.1038/ncb2410.
- Cho, S.-J., H. Lee, S. Dutta, J. Song, R. Walikonis, and I.S. Moon. 2011. Septin 6 regulates the cytoarchitecture of neurons through localization at dendritic branch points and bases of protrusions. *Mol Cells*. 32:89–98. doi:10.1007/s10059-011-1048-9.
- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, and M. Mann. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325:834–840. doi:10.1126/science.1175371.
- Chu, C.-W., F. Hou, J. Zhang, L. Phu, A.V. Loktev, D.S. Kirkpatrick, P.K. Jackson, Y. Zhao, and H. Zou. 2011. A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell*. 22:448–456. doi:10.1091/mbc.E10-03-0203.
- Chu, H.M.A., M. Yun, D.E. Anderson, H. Sage, H.-W. Park, and S.A. Endow. 2005. Kar3 interaction with Cik1 alters motor structure and function. *EMBO J*. 24:3214–3223. doi:10.1038/sj.emboj.7600790.

- Clark, G.D. 2002. Brain development and the genetics of brain development. *Neurologic Clinics*. 20:917–939. doi:10.1016/S0733-8619(02)00024-5.
- Connolly, D., Z. Yang, M. Castaldi, N. Simmons, M.H. Oktay, S. Coniglio, M.J. Fazzari, P. Verdier-Pinard, and C. Montagna. 2011. Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 13:R76. doi:10.1186/bcr2924.
- Corthésy-Theulaz, I., A. Pauloin, and S.R. Pfeffer. 1992. Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J Cell Biol*. 118:1333–1345. doi:10.1083/jcb.118.6.1333.
- Cowppli-Bony, A., M. Colonna, K. Ligier, V. Jooste, G. Defossez, A. Monnereau, B. Amadeo, P. Arveux, I. Baldi, S. Bara, A.-M. Bouvier, V. Bouvier, J. Clavel, M. Colonna, G. Coureau, A. Cowppli-Bony, T. Dalmeida, L. Daubisse-Marliac, G. Defossez, P. Delafosse, J. Deloumeaux, P. Grosclaude, A.-V. Guizard, C. Joachim, B. Lacour, B. Lapôtre-Ledoux, E. Marrer, M. Maynadié, F. Molinié, A. Monnereau, J.-B. Nousbaum, J. Plenet, S. Plouvier, C. Pouchieu, M. Robaszekiewicz, C. Schvartz, B. Trétarre, X. Troussard, M. Velten, and A.-S. Woronoff. 2019. Épidémiologie descriptive des cancers en France métropolitaine : incidence, survie et prévalence. *Bulletin du Cancer*. 106:617–634. doi:10.1016/j.bulcan.2018.11.016.
- Cox, G.A., C.L. Mahaffey, A. Nystuen, V.A. Letts, and W.N. Frankel. 2000. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat Genet*. 26:198–202. doi:10.1038/79923.
- Crawley, S.W., M.S. Mooseker, and M.J. Tyska. 2014. Shaping the intestinal brush border. *J Cell Biol*. 207:441–451. doi:10.1083/jcb.201407015.
- Daire, V., J. Giustiniani, I. Leroy-Gori, M. Quesnoit, S. Drevensek, A. Dimitrov, F. Perez, and C. Poüs. 2009. Kinesin-1 regulates microtubule dynamics via a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 284:31992–32001. doi:10.1074/jbc.M109.007906.
- Darshan, M.S., M.S. Loftus, M. Thadani-Mulero, B.P. Levy, D. Escuin, X.K. Zhou, A. Gjyzezi, C. Chanel-Vos, R. Shen, S.T. Tagawa, N.H. Bander, D.M. Nanus, and P. Giannakakou. 2011. Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Research*. 71:6019–6029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1417.
- Delevoe, C., S. Miserey-Lenkei, G. Montagnac, F. Gilles-Marsens, P. Paul-Gilloteaux, F. Giordano, F. Waharte, M.S. Marks, B. Goud, and G. Raposo. 2014. Recycling endosome tubule morphogenesis from sorting endosomes requires the kinesin motor KIF13A. *Cell Rep*. 6:445–454. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.002.
- Desai, A., S. Verma, T.J. Mitchison, and C.E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*. 96:69–78. doi:10.1016/S0092-8674(00)80960-5.
- Desai, N., V. Trieu, Z. Yao, L. Louie, S. Ci, A. Yang, C. Tao, T. De, B. Beals, D. Dykes, P. Noker, R. Yao, E. Labao, M. Hawkins, and P. Soon-Shiong. 2006. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin. Cancer Res*. 12:1317–1324. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1634.

- Dever, T.E., M.J. Glynias, and W.C. Merrick. 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:1814–1818. doi:10.1073/pnas.84.7.1814.
- Diamantopoulos, G.S., F. Perez, H.V. Goodson, G. Batelier, R. Melki, T.E. Kreis, and J.E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J Cell Biol.* 144:99–112. doi:10.1083/jcb.144.1.99.
- Diesenberg, K., M. Beerbaum, U. Fink, P. Schmieder, and M. Krauss. 2015. SEPT9 negatively regulates ubiquitin-dependent downregulation of EGFR. *J Cell Sci.* 128:397–407. doi:10.1242/jcs.162206.
- van Dijk, J., K. Rogowski, J. Miro, B. Lacroix, B. Eddé, and C. Janke. 2007. A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylation. *Molecular Cell.* 26:437–448. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.012.
- Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Poüs, and F. Perez. 2008. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science.* 322:1353–1356. doi:10.1126/science.1165401.
- Ding, X., W. Yu, M. Liu, S. Shen, F. Chen, L. Cao, B. Wan, and L. Yu. 2008. GTP binding is required for SEPT12 to form filaments and to interact with SEPT11. *Mol. Cells.* 25:385–389.
- Dixit, R., B. Barnett, J.E. Lazarus, M. Tokito, Y.E. Goldman, and E.L.F. Holzbaur. 2009. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:492–497. doi:10.1073/pnas.0807614106.
- Dolat, L., Q. Hu, and E.T. Spiliotis. 2014a. Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biol Chem.* 395:123–141. doi:10.1515/hsz-2013-0233.
- Dolat, L., J.L. Hunyara, J.R. Bowen, E.P. Karasmanis, M. Elgawly, V.E. Galkin, and E.T. Spiliotis. 2014b. Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *J. Cell Biol.* 207:225–235. doi:10.1083/jcb.201405050.
- Dolat, L., and E.T. Spiliotis. 2016. Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion. *Journal of Cell Biology.* 214:517–527. doi:10.1083/jcb.201603030.
- Douglas, L.M., F.J. Alvarez, C. McCreary, and J.B. Konopka. 2005. Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. *Eukaryotic Cell.* 4:1503–1512. doi:10.1128/EC.4.9.1503-1512.2005.
- Doxsey, S. 2001. Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:688–698. doi:10.1038/35089575.
- Drabek, K., M. van Ham, T. Stepanova, K. Draegestein, R. van Horsen, C.L. Sayas, A. Akhmanova, T. ten Hagen, R. Smits, R. Fodde, F. Grosveld, and N. Galjart. 2006. Role of CLASP2 in Microtubule Stabilization and the Regulation of Persistent Motility. *Current Biology.* 16:2259–2264. doi:10.1016/j.cub.2006.09.065.
- Duncan, J.E., and L.S.B. Goldstein. 2006. The Genetics of Axonal Transport and Axonal Transport Disorders. *PLoS Genet.* 2:e124. doi:10.1371/journal.pgen.0020124.



- Edde, B., J. Rossier, J. Le Caer, E. Desbruyeres, F. Gros, and P. Denoulet. 1990. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science*. 247:83–85. doi:10.1126/science.1967194.
- Efimov, A., A. Kharitonov, N. Efimova, J. Loncarek, P.M. Miller, N. Andreyeva, P. Gleeson, N. Galjart, A.R.R. Maia, I.X. McLeod, J.R. Yates, H. Maiato, A. Khodjakov, A. Akhmanova, and I. Kaverina. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell*. 12:917–930. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.002.
- Efimov, A., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, R. Ohi, M.C. Brown, C.E. Turner, J.V. Small, and I. Kaverina. 2008. Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *J Cell Sci*. 121:196–204. doi:10.1242/jcs.012666.
- El Amine, N., A. Kechad, S. Jananji, and G.R.X. Hickson. 2013. Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *J Cell Biol*. 203:487–504. doi:10.1083/jcb.201305053.
- Eluère, R., I. Varlet, A. Bernadac, and M.-N. Simon. 2012. Cdk and the anillin homolog Bud4 define a new pathway regulating septin organization in yeast. *Cell Cycle*. 11:151–158. doi:10.4161/cc.11.1.18542.
- Errico, A., A. Ballabio, and E.I. Rugarli. 2002. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum. Mol. Genet*. 11:153–163. doi:10.1093/hmg/11.2.153.
- Erwig, M.S., J. Patzig, A.M. Steyer, P. Dibaj, M. Heilmann, I. Heilmann, R.B. Jung, K. Kusch, W. Möbius, O. Jahn, K.-A. Nave, and H.B. Werner. 2019. Anillin facilitates septin assembly to prevent pathological outfoldings of central nervous system myelin. *Elife*. 8. doi:10.7554/eLife.43888.
- Estey, M.P., C. Di Ciano-Oliveira, C.D. Froese, M.T. Bejide, and W.S. Trimble. 2010. Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *J. Cell Biol*. 191:741–749. doi:10.1083/jcb.201006031.
- Estrem, C., C.P. Fees, and J.K. Moore. 2017. Dynein is regulated by the stability of its microtubule track. *J Cell Biol*. 216:2047–2058. doi:10.1083/jcb.201611105.
- Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42 - the centre of polarity. *Journal of Cell Science*. 117:1291–1300. doi:10.1242/jcs.01115.
- Etienne-Manneville, S. 2010. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Current Opinion in Cell Biology*. 22:104–111. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.008.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629–635. doi:10.1038/nature01148.
- Ewers, H., T. Tada, J.D. Petersen, B. Racz, M. Sheng, and D. Choquet. 2014. A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. *PLoS One*. 9:e113916. doi:10.1371/journal.pone.0113916.
- Fagerberg, L., B.M. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpour, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjöstedt, E. Lundberg, C.A.-K. Szigartyo, M. Skogs, J.O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J.M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten, and M. Uhlén. 2014. Analysis of

- the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell Proteomics*. 13:397–406. doi:10.1074/mcp.M113.035600.
- Faire, K., C.M. Waterman-Storer, D. Gruber, D. Masson, E.D. Salmon, and J.C. Bulinski. 1999. E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J Cell Sci*. 112 (Pt 23):4243–4255.
- Farías, G.G., A. Fréal, E. Tortosa, R. Stucchi, X. Pan, S. Portegies, L. Will, M. Altelaar, and C.C. Hoogenraad. 2019. Feedback-Driven Mechanisms between Microtubules and the Endoplasmic Reticulum Instruct Neuronal Polarity. *Neuron*. 102:184–201.e8. doi:10.1016/j.neuron.2019.01.030.
- Farrugia, A.J., and F. Calvo. 2016. The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. *Biochem. Soc. Trans.* 44:1709–1716. doi:10.1042/BST20160219.
- Farrugia, A.J., and F. Calvo. 2017. Cdc42 regulates Cdc42EP3 function in cancer-associated fibroblasts. *Small GTPases*. 8:49–57. doi:10.1080/21541248.2016.1194952.
- Farrugia, A.J., J. Rodríguez, J.L. Orgaz, M. Lucas, V. Sanz-Moreno, and F. Calvo. 2020. CDC42EP5/BORG3 modulates SEPT9 to promote actomyosin function, migration, and invasion. *Journal of Cell Biology*. 219:e201912159. doi:10.1083/jcb.201912159.
- Fededa, J.P., and D.W. Gerlich. 2012. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* 14:440–447. doi:10.1038/ncb2482.
- Fedorova, M., T. Todorovsky, N. Kuleva, and R. Hoffmann. 2010. Quantitative evaluation of tryptophan oxidation in actin and troponin I from skeletal muscles using a rat model of acute oxidative stress. *Proteomics*. 10:2692–2700. doi:10.1002/pmic.201000147.
- Ferlini, C., L. Cicchillitti, G. Raspaglio, S. Bartollino, S. Cimitan, C. Bertucci, S. Mozzetti, D. Gallo, M. Persico, C. Fattorusso, G. Campiani, and G. Scambia. 2009. Paclitaxel Directly Binds to Bcl-2 and Functionally Mimics Activity of Nur77. *Cancer Research*. 69:6906–6914. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0540.
- Field, C.M., O. al-Awar, J. Rosenblatt, M.L. Wong, B. Alberts, and T.J. Mitchison. 1996. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J. Cell Biol.* 133:605–616. doi:10.1083/jcb.133.3.605.
- Field, C.M., and D. Kellogg. 1999. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol.* 9:387–394. doi:10.1016/s0962-8924(99)01632-3.
- Field, J.J., A. Kanakkanthara, and J.H. Miller. 2014. Microtubule-targeting agents are clinically successful due to both mitotic and interphase impairment of microtubule function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22:5050–5059. doi:10.1016/j.bmc.2014.02.035.
- Finger, F.P., K.R. Kopish, and J.G. White. 2003. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Dev Biol*. 261:220–234. doi:10.1016/s0012-1606(03)00296-3.
- Fletcher, D.A., and R.D. Mullins. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 463:485–492. doi:10.1038/nature08908.

- Flor-Parra, I., A.B. Iglesias-Romero, and F. Chang. 2018. The XMAP215 Ortholog Alp14 Promotes Microtubule Nucleation in Fission Yeast. *Current Biology*. 28:1681-1691.e4. doi:10.1016/j.cub.2018.04.008.
- Fojo, A.T., and M. Menefee. 2005. Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin. Oncol.* 32:S3-8. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.09.010.
- de Forges, H., A. Pilon, I. Cantaloube, A. Pallandre, A.-M. Haghiri-Gosnet, F. Perez, and C. Poüs. 2016. Localized Mechanical Stress Promotes Microtubule Rescue. *Curr Biol*. 26:3399–3406. doi:10.1016/j.cub.2016.10.048.
- Fourest-Lieuvin, A., L. Peris, V. Gache, I. Garcia-Saez, C. Juillan-Binard, V. Lantez, and D. Job. 2006. Microtubule Regulation in Mitosis: Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-dependent Kinase Cdk1. *MBoC*. 17:1041–1050. doi:10.1091/mbc.e05-07-0621.
- Fourriere, L., S. Divoux, M. Roceri, F. Perez, and G. Boncompain. 2016. Microtubule-independent secretion requires functional maturation of Golgi elements. *J Cell Sci*. 129:3238–3250. doi:10.1242/jcs.188870.
- Fraschini, R. 2020. Cytokinesis in Eukaryotic Cells: The Furrow Complexity at a Glance. *Cells*. 9:271. doi:10.3390/cells9020271.
- Frazier, J.A., M.L. Wong, M.S. Longtine, J.R. Pringle, M. Mann, T.J. Mitchison, and C. Field. 1998. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J. Cell Biol.* 143:737–749. doi:10.1083/jcb.143.3.737.
- Frémont, S., G. Romet-Lemonne, A. Houdusse, and A. Echard. 2017a. Emerging roles of MICAL family proteins – from actin oxidation to membrane trafficking during cytokinesis. *J Cell Sci*. 130:1509–1517. doi:10.1242/jcs.202028.
- Frémont, S., H. Hammich, J. Bai, H. Wioland, K. Klinkert, M. Rocancourt, C. Kikuti, D. Stroebel, G. Romet-Lemonne, O. Pylypenko, A. Houdusse, and A. Echard. 2017b. Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis. *Nat Commun*. 8:14528. doi:10.1038/ncomms14528.
- Froidevaux-Klipfel, L., F. Poirier, C. Boursier, R. Crépin, C. Poüs, B. Baudin, and A. Baillet. 2011. Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics*. 11:3877–3886. doi:10.1002/pmic.201000789.
- Froidevaux-Klipfel, L., B. Targa, I. Cantaloube, H. Ahmed-Zaïd, C. Poüs, and A. Baillet. 2015. Septin cooperation with tubulin polyglutamylation contributes to cancer cell adaptation to taxanes. *Oncotarget*. 6:36063–36080. doi:10.18632/oncotarget.5373.
- Fujishima, K., H. Kiyonari, J. Kurisu, T. Hirano, and M. Kengaku. 2007. Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. *J. Neurochem*. 102:77–92. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04478.x.
- Fukata, M., S. Kuroda, K. Fujii, T. Nakamura, I. Shoji, Y. Matsuura, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1997. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem*. 272:29579–29583. doi:10.1074/jbc.272.47.29579.

- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 109:873–885. doi:10.1016/s0092-8674(02)00800-0.
- Fukuda, Y., A. Luchniak, E.R. Murphy, and M.L. Gupta. 2014. Spatial control of microtubule length and lifetime by opposing stabilizing and destabilizing functions of Kinesin-8. *Curr Biol*. 24:1826–1835. doi:10.1016/j.cub.2014.06.069.
- Fung, K.Y.Y., L. Dai, and W.S. Trimble. 2014. Cell and Molecular Biology of Septins. *In International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier. 289–339.
- Gallaud, E., R. Caous, A. Pascal, F. Bazile, J.-P. Gagné, S. Huet, G.G. Poirier, D. Chrétien, L. Richard-Parpaillon, and R. Giet. 2014. Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells. *J Cell Biol*. 204:1111–1121. doi:10.1083/jcb.201311094.
- Gamblin, T.C., K. Nachmanoff, S. Halpain, and R.C. Williams. 1996. Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules. *Biochemistry*. 35:12576–12586. doi:10.1021/bi961135d.
- Gao, L., L. Bai, and Q. zhen Nan. 2013. Activation of Rho GTPase Cdc42 promotes adhesion and invasion in colorectal cancer cells. *Med Sci Monit Basic Res*. 19:201–207. doi:10.12659/MSMBR.883983.
- Garcia, G., A. Bertin, Z. Li, Y. Song, M.A. McMurray, J. Thorner, and E. Nogales. 2011. Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J. Cell Biol*. 195:993–1004. doi:10.1083/jcb.201107123.
- García-Fernández, M., H. Kissel, S. Brown, T. Gorenc, A.J. Schile, S. Rafii, S. Larisch, and H. Steller. 2010. Sept4/ARTS is required for stem cell apoptosis and tumor suppression. *Genes Dev*. 24:2282–2293. doi:10.1101/gad.1970110.
- Garcin, C., and A. Straube. 2019. Microtubules in cell migration. *Essays Biochem*. 63:509–520. doi:10.1042/EBC20190016.
- Gardner, M.K., D.C. Bouck, L.V. Paliulis, J.B. Meehl, E.T. O’Toole, J. Haase, A. Soubry, A.P. Joglekar, M. Winey, E.D. Salmon, K. Bloom, and D.J. Odde. 2008. Chromosome congression by Kinesin-5 motor-mediated disassembly of longer kinetochore microtubules. *Cell*. 135:894–906. doi:10.1016/j.cell.2008.09.046.
- Gerth, K., N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, and H. Reichenbach. 1996. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot*. 49:560–563. doi:10.7164/antibiotics.49.560.
- Giannakakou, P., M. Nakano, K.C. Nicolaou, A. O’Brate, J. Yu, M.V. Blagosklonny, U.F. Greber, and T. Fojo. 2002. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:10855–10860. doi:10.1073/pnas.132275599.
- Gigant, B., C. Wang, R.B.G. Ravelli, F. Roussi, M.O. Steinmetz, P.A. Curmi, A. Sobel, and M. Knossow. 2005. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*. 435:519–522. doi:10.1038/nature03566.

- Gilad, R., K. Meir, I. Stein, L. German, E. Pikarsky, and N.J. Mabeesh. 2015. High SEPT9\_i1 protein expression is associated with high-grade prostate cancers. *PLoS ONE*. 10:e0124251. doi:10.1371/journal.pone.0124251.
- Gilden, J.K., S. Peck, Y.-C.M. Chen, and M.F. Krummel. 2012. The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing. *J. Cell Biol.* 196:103–114. doi:10.1083/jcb.201105127.
- Gladfelter, A.S., I. Bose, T.R. Zyla, E.S.G. Bardes, and D.J. Lew. 2002. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J. Cell Biol.* 156:315–326. doi:10.1083/jcb.200109062.
- Gladfelter, A.S., J.R. Pringle, and D.J. Lew. 2001. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:681–689. doi:10.1016/s1369-5274(01)00269-7.
- Golan, M., and N.J. Mabeesh. 2013. SEPT9\_i1 is required for the association between HIF-1 $\alpha$  and importin- $\alpha$  to promote efficient nuclear translocation. *Cell Cycle*. 12:2297–2308. doi:10.4161/cc.25379.
- Gonzalez, M.E., O. Makarova, E.A. Peterson, L.M. Privette, and E.M. Petty. 2009. Up-regulation of SEPT9\_v1 stabilizes c-Jun-N-terminal kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells. *Cell. Signal.* 21:477–487. doi:10.1016/j.cellsig.2008.11.007.
- Gonzalez-Garay, M.L., L. Chang, K. Blade, D.R. Menick, and F. Cabral. 1999. A beta-tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance. *J. Biol. Chem.* 274:23875–23882. doi:10.1074/jbc.274.34.23875.
- Gorman, J.A., A. Babich, C.J. Dick, R.A. Schoon, A. Koenig, T.S. Gomez, J.K. Burkhardt, and D.D. Billadeau. 2012. The cytoskeletal adaptor protein IQGAP1 regulates TCR-mediated signaling and filamentous actin dynamics. *J Immunol.* 188:6135–6144. doi:10.4049/jimmunol.1103487.
- Goshima, G., M. Mayer, N. Zhang, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol.* 181:421–429. doi:10.1083/jcb.200711053.
- Granger, E., G. McNee, V. Allan, and P. Woodman. 2014. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 31:20–29. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.011.
- Guéritte-Voegelein, F., D. Guénard, and P. Potier. 1987. Taxol and derivatives: a biogenetic hypothesis. *J Nat Prod.* 50:9–18. doi:10.1021/np50049a002.
- Gundersen, G.G. 2002. Microtubule capture: IQGAP and CLIP-170 expand the repertoire. *Curr Biol.* 12:R645-647. doi:10.1016/s0960-9822(02)01156-9.
- Gundersen, G.G., and T.A. Cook. 1999. Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:81–94. doi:10.1016/s0955-0674(99)80010-6.
- Gupta, M.L., P. Carvalho, D.M. Roof, and D. Pellman. 2006. Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat Cell Biol.* 8:913–923. doi:10.1038/ncb1457.

- Haarer, B.K., and J.R. Pringle. 1987. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol. Cell. Biol.* 7:3678–3687. doi:10.1128/mcb.7.10.3678.
- Hait, W.N., and J.-M. Yang. 2006. The individualization of cancer therapy: the unexpected role of p53. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 117:85–101; discussion 101.
- Hall, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem. Soc. Trans.* 33:891–895. doi:10.1042/BST20050891.
- Hallak, M.E., J.A. Rodriguez, H.S. Barra, and R. Caputto. 1977. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Letters.* 73:147–150. doi:10.1016/0014-5793(77)80968-X.
- Hamel, E., B.W. Day, J.H. Miller, M.K. Jung, P.T. Northcote, A.K. Ghosh, D.P. Curran, M. Cushman, K.C. Nicolaou, I. Paterson, and E.J. Sorensen. 2006. Synergistic Effects of Peloruside A and Laulimalide with Taxoid Site Drugs, but Not with Each Other, on Tubulin Assembly. *Mol Pharmacol.* 70:1555–1564. doi:10.1124/mol.106.027847.
- Hanai, N., K. Nagata, A. Kawajiri, T. Shiromizu, N. Saitoh, Y. Hasegawa, S. Murakami, and M. Inagaki. 2004. Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett.* 568:83–88. doi:10.1016/j.febslet.2004.05.030.
- Hanlon, D.W., Z. Yang, and L.S. Goldstein. 1997. Characterization of KIFC2, a neuronal kinesin superfamily member in mouse. *Neuron.* 18:439–451. doi:10.1016/s0896-6273(00)81244-1.
- Hardt, I.H., H. Steinmetz, K. Gerth, F. Sasse, H. Reichenbach, and G. Höfle. 2001. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J. Nat. Prod.* 64:847–856. doi:10.1021/np000629f.
- Hartman, M.A., and J.A. Spudich. 2012. The myosin superfamily at a glance. *Journal of Cell Science.* 125:1627–1632. doi:10.1242/jcs.094300.
- Hartwell, L. 1971. Genetic control of the cell division cycle in yeast \*1V. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research.* 69:265–276. doi:10.1016/0014-4827(71)90223-0.
- Hasegawa, S., Y. Miyoshi, C. Egawa, M. Ishitobi, T. Taguchi, Y. Tamaki, M. Monden, and S. Noguchi. 2003. Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 9:2992–2997.
- Hayashi, I., and M. Ikura. 2003. Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem.* 278:36430–36434. doi:10.1074/jbc.M305773200.
- Helenius, J., G. Brouhard, Y. Kalaidzidis, S. Diez, and J. Howard. 2006. The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature.* 441:115–119. doi:10.1038/nature04736.
- Henrie, H., D. Bakhos-Douaihy, I. Cantaloube, A. Pilon, M. Talantikite, V. Stoppin-Mellet, A. Baillet, C. Poüs, and B. Benoit. 2020. Stress-induced phosphorylation of CLIP-170 by JNK promotes microtubule rescue. *Journal of Cell Biology.* 219:e201909093. doi:10.1083/jcb.201909093.

- Henty-Ridilla, J.L., A. Rankova, J.A. Eskin, K. Kenny, and B.L. Goode. 2016. Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends. *Science*. 352:1004–1009. doi:10.1126/science.aaf1709.
- Herman, B., M.A. Langevin, and D.F. Albertini. 1983. The effects of taxol on the organization of the cytoskeleton in cultured ovarian granulosa cells. *Eur J Cell Biol*. 31:34–45.
- Hernández-Rodríguez, Y., and M. Momany. 2012. Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Curr. Opin. Microbiol*. 15:660–668. doi:10.1016/j.mib.2012.09.007.
- Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka, and S. Niwa. 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:682–696. doi:10.1038/nrm2774.
- Hirsch, D.S., D.M. Pirone, and P.D. Burbelo. 2001. A new family of Cdc42 effector proteins, CEPs, function in fibroblast and epithelial cell shape changes. *J. Biol. Chem*. 276:875–883. doi:10.1074/jbc.M007039200.
- Holmes, K.C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*. 347:44–49. doi:10.1038/347044a0.
- Holmes, K.V., and P.W. Choppin. 1968. On the role of microtubules in movement and alignment of nuclei in virus-induced syncytia. *J Cell Biol*. 39:526–543. doi:10.1083/jcb.39.3.526.
- Holz, D., and D. Vavylonis. 2018. Building a dendritic actin filament network branch by branch: models of filament orientation pattern and force generation in lamellipodia. *Biophys Rev*. 10:1577–1585. doi:10.1007/s12551-018-0475-7.
- Honnappa, S., B. Cutting, W. Jahnke, J. Seelig, and M.O. Steinmetz. 2003. Thermodynamics of the Op18/stathmin-tubulin interaction. *J. Biol. Chem*. 278:38926–38934. doi:10.1074/jbc.M305546200.
- Honnappa, S., S.M. Gouveia, A. Weisbrich, F.F. Damberger, N.S. Bhavesh, H. Jawhari, I. Grigoriev, F.J.A. van Rijssel, R.M. Buey, A. Lawera, I. Jelesarov, F.K. Winkler, K. Wüthrich, A. Akhmanova, and M.O. Steinmetz. 2009. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell*. 138:366–376. doi:10.1016/j.cell.2009.04.065.
- Honore, S., E. Pasquier, and D. Braguer. 2005. Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 62:3039–3056. doi:10.1007/s00018-005-5330-x.
- Hopper-Borge, E., Z.-S. Chen, I. Shchavezleva, M.G. Belinsky, and G.D. Kruh. 2004. Analysis of the Drug Resistance Profile of Multidrug Resistance Protein 7 (ABCC10): Resistance to Docetaxel. *Cancer Res*. 64:4927–4930. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3111.
- Howe, C.L., and M.S. Mooseker. 1983. Characterization of the 110-kdalton actin-calmodulin-, and membrane-binding protein from microvilli of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*. 97:974–985. doi:10.1083/jcb.97.4.974.
- Hsu, S.C., C.D. Hazuka, R. Roth, D.L. Foletti, J. Heuser, and R.H. Scheller. 1998. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron*. 20:1111–1122. doi:10.1016/s0896-6273(00)80493-6.

- Hsu, V.W., and R. Prekeris. 2010. Transport at the recycling endosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:528–534. doi:10.1016/j.ceb.2010.05.008.
- Hu, J., X. Bai, J.R. Bowen, L. Dolat, F. Korobova, W. Yu, P.W. Baas, T. Svitkina, G. Gallo, and E.T. Spiliotis. 2012. Septin-Driven Coordination of Actin and Microtubule Remodeling Regulates the Collateral Branching of Axons. *Current Biology.* 22:1109–1115. doi:10.1016/j.cub.2012.04.019.
- Hu, Q., L. Milenkovic, H. Jin, M.P. Scott, M.V. Nachury, E.T. Spiliotis, and W.J. Nelson. 2010. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science.* 329:436–439. doi:10.1126/science.1191054.
- Huang, C., X. Zhang, L. Jiang, L. Zhang, M. Xiang, and H. Ren. 2019. FoxM1 Induced Paclitaxel Resistance via Activation of the FoxM1/PHB1/RAF-MEK-ERK Pathway and Enhancement of the ABCA2 Transporter. *Molecular Therapy - Oncolytics.* 14:196–212. doi:10.1016/j.omto.2019.05.005.
- Huang, C.-Y., Y.-Y. Wang, Y.-L. Chen, M.-F. Chen, H.-S. Chiang, P.-L. Kuo, and Y.-H. Lin. 2018. CDC42 Negatively Regulates Testis-Specific SEPT12 Polymerization. *Int J Mol Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19092627.
- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.-F. Wang, and T.-P. Yao. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 417:455–458. doi:10.1038/417455a.
- Huisman, M.T., A.A. Chhatta, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, and A.H. Schinkel. 2005. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *Int. J. Cancer.* 116:824–829. doi:10.1002/ijc.21013.
- Hung, R.-J., C.W. Pak, and J.R. Terman. 2011. Direct Redox Regulation of F-Actin Assembly and Disassembly by Mical. *Science.* 334:1710–1713. doi:10.1126/science.1211956.
- Hung, R.-J., U. Yazdani, J. Yoon, H. Wu, T. Yang, N. Gupta, Z. Huang, W.J.H. van Berkel, and J.R. Terman. 2010. Mical links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature.* 463:823–827. doi:10.1038/nature08724.
- Hunter, A.W., M. Caplow, D.L. Coy, W.O. Hancock, S. Diez, L. Wordeman, and J. Howard. 2003. The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol. Cell.* 11:445–457. doi:10.1016/s1097-2765(03)00049-2.
- Hurtado, L., C. Caballero, M.P. Gavilan, J. Cardenas, M. Bornens, and R.M. Rios. 2011. Disconnecting the Golgi ribbon from the centrosome prevents directional cell migration and ciliogenesis. *J Cell Biol.* 193:917–933. doi:10.1083/jcb.201011014.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews.* 91:119–149. doi:10.1152/physrev.00059.2009.
- Hyman, A., and E. Karsenti. 1998. The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J. Cell. Sci.* 111 ( Pt 15):2077–2083.
- Ito, H., K. Atsuzawa, R. Morishita, N. Usuda, K. Sudo, I. Iwamoto, K. Mizutani, R. Katoh-Semba, Y. Nozawa, T. Asano, and K. Nagata. 2009. Sept8 controls the binding of vesicle-associated



- membrane protein 2 to synaptophysin. *J Neurochem.* 108:867–880. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05849.x.
- Iwasa, J.H., and R.D. Mullins. 2007. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* 17:395–406. doi:10.1016/j.cub.2007.02.012.
- Iwase, M., J. Luo, S. Nagaraj, M. Longtine, H.B. Kim, B.K. Haarer, C. Caruso, Z. Tong, J.R. Pringle, and E. Bi. 2006. Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol. Biol. Cell.* 17:1110–1125. doi:10.1091/mbc.e05-08-0793.
- Izutsu, N., C. Maesawa, M. Shibazaki, H. Oikawa, T. Shoji, T. Sugiyama, and T. Masuda. 2008. Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.* 32:1227–1235. doi:10.3892/ijo\_32\_6\_1227.
- Janke, C. 2005. Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family. *Science.* 308:1758–1762. doi:10.1126/science.1113010.
- Janke, C. 2014. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *Journal of Cell Biology.* 206:461–472. doi:10.1083/jcb.201406055.
- Janke, C., and J.C. Bulinski. 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:773–786. doi:10.1038/nrm3227.
- Janke, C., and G. Montagnac. 2017. Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr. Biol.* 27:R1287–R1292. doi:10.1016/j.cub.2017.10.044.
- Jánosi, I.M., D. Chrétien, and H. Flyvbjerg. 2002. Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state. *Biophys. J.* 83:1317–1330. doi:10.1016/S0006-3495(02)73902-7.
- Janson, M.E., M.E. de Dood, and M. Dogterom. 2003. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *J. Cell Biol.* 161:1029–1034. doi:10.1083/jcb.200301147.
- Jensen-Smith, H.C., R.F. Ludueña, and R. Hallworth. 2003. Requirement for the beta1 and betaIV tubulin isoforms in mammalian cilia. *Cell Motil Cytoskeleton.* 55:213–220. doi:10.1002/cm.10122.
- Jiang, K., J. Wang, J. Liu, T. Ward, L. Wordeman, A. Davidson, F. Wang, and X. Yao. 2009. TIP150 interacts with and targets MCAK at the microtubule plus ends. *EMBO Rep.* 10:857–865. doi:10.1038/embor.2009.94.
- Jiao, F., K.S. Cannon, Y.-C. Lin, A.S. Gladfelter, and S. Scheuring. 2020. The hierarchical assembly of septins revealed by high-speed AFM. *Nat Commun.* 11:5062. doi:10.1038/s41467-020-18778-x.
- Joberty, G., R.R. Perlungher, and I.G. Macara. 1999. The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19:6585–6597. doi:10.1128/mcb.19.10.6585.
- Joberty, G., R.R. Perlungher, P.J. Sheffield, M. Kinoshita, M. Noda, T. Haystead, and I.G. Macara. 2001. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell Biol.* 3:861–866. doi:10.1038/ncb1001-861.
- Johnson, E.S., and G. Blobel. 1999. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J. Cell Biol.* 147:981–994. doi:10.1083/jcb.147.5.981.

- Johnston, A.B., A. Collins, and B.L. Goode. 2015. High-speed depolymerization at actin filament ends jointly catalysed by Twinfilin and Srv2/CAP. *Nat. Cell Biol.* 17:1504–1511. doi:10.1038/ncb3252.
- Joo, E., M.C. Surka, and W.S. Trimble. 2007. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev. Cell.* 13:677–690. doi:10.1016/j.devcel.2007.09.001.
- Joo, E., C.W. Tsang, and W.S. Trimble. 2005. Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic.* 6:626–634. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00305.x.
- Jordan, M.A., and L. Wilson. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 4:253–265. doi:10.1038/nrc1317.
- Kadkol, S.S., A. Bruno, S. Oh, M.L. Schmidt, and V. Lindgren. 2006. MLL-SEPT6 fusion transcript with a novel sequence in an infant with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 168:162–167. doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.02.020.
- Kalikin, L.M., H.L. Sims, and E.M. Petty. 2000. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics.* 63:165–172. doi:10.1006/geno.1999.6077.
- Kamasaki, T., E. O’Toole, S. Kita, M. Osumi, J. Usukura, J.R. McIntosh, and G. Goshima. 2013. Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle. *J Cell Biol.* 202:25–33. doi:10.1083/jcb.201304031.
- Kamath, K., and M.A. Jordan. 2003. Suppression of microtubule dynamics by epothilone B is associated with mitotic arrest. *Cancer Res.* 63:6026–6031.
- Kampan, N.C., M.T. Madondo, O.M. McNally, M. Quinn, and M. Plebanski. 2015. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int.* 2015:413076. doi:10.1155/2015/413076.
- Kaneko, A., T. Umeyama, N. Hanaoka, B.C. Monk, Y. Uehara, and M. Niimi. 2004. Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast.* 21:1025–1033. doi:10.1002/yea.1147.
- Kang, P.J., M.E. Lee, and H.-O. Park. 2014. Bud3 activates Cdc42 to establish a proper growth site in budding yeast. *Journal of Cell Biology.* 206:19–28. doi:10.1083/jcb.201402040.
- Karasmanis, E.P., D. Hwang, K. Nakos, J.R. Bowen, D. Angelis, and E.T. Spiliotis. 2019. A Septin Double Ring Controls the Spatiotemporal Organization of the ESCRT Machinery in Cytokinetic Abscission. *Curr Biol.* 29:2174–2182.e7. doi:10.1016/j.cub.2019.05.050.
- Kashiwaya, K., H. Nakagawa, M. Hosokawa, Y. Mochizuki, K. Ueda, L. Piao, S. Chung, R. Hamamoto, H. Eguchi, H. Ohigashi, O. Ishikawa, C. Janke, Y. Shinomura, and Y. Nakamura. 2010. Involvement of the Tubulin Tyrosine Ligase-Like Family Member 4 Polyglutamylase in PELP1 Polyglutamylation and Chromatin Remodeling in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research.* 70:4024–4033. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4444.
- Kavallaris, M., D.Y. Kuo, C.A. Burkhart, D.L. Regl, M.D. Norris, M. Haber, and S.B. Horwitz. 1997. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J. Clin. Invest.* 100:1282–1293. doi:10.1172/JCI119642.

- Keating, T.J., J.G. Peloquin, V.I. Rodionov, D. Momcilovic, and G.G. Borisy. 1997. Microtubule release from the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5078–5083. doi:10.1073/pnas.94.10.5078.
- Kesisova, I.A., B.P. Robinson, and E.T. Spiliotis. 2020. A septin GTPase scaffold of dynein-dynactin motors triggers retrograde lysosome transport. (Cell Biology), Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.01.128488v1> [Accessed June 02, 2020].
- Kim, H.B., B.K. Haarer, and J.R. Pringle. 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J. Cell Biol.* 112:535–544. doi:10.1083/jcb.112.4.535.
- Kim, M.S., C.D. Froese, M.P. Estey, and W.S. Trimble. 2011. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* 195:815–826. doi:10.1083/jcb.201106131.
- Kim, M.S., C.D. Froese, H. Xie, and W.S. Trimble. 2012. Uncovering Principles That Control Septin-Septin Interactions. *J. Biol. Chem.* 287:30406–30413. doi:10.1074/jbc.M112.387464.
- Kimura, Y., N. Kurabe, K. Ikegami, K. Tsutsumi, Y. Konishi, O.I. Kaplan, H. Kunitomo, Y. Iino, O.E. Blacque, and M. Setou. 2010. Identification of Tubulin Deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and Mammalian Cytosolic Carboxypeptidases (CCPs). *J. Biol. Chem.* 285:22936–22941. doi:10.1074/jbc.C110.128280.
- King, S.J., and T.A. Schroer. 2000. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol.* 2:20–24. doi:10.1038/71338.
- Kinoshita, A., M. Kinoshita, H. Akiyama, H. Tomimoto, I. Akiguchi, S. Kumar, M. Noda, and J. Kimura. 1998. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 153:1551–1560. doi:10.1016/S0002-9440(10)65743-4.
- Kinoshita, M. 2003. Assembly of mammalian septins. *J. Biochem.* 134:491–496. doi:10.1093/jb/mvg182.
- Kinoshita, M., C.M. Field, M.L. Coughlin, A.F. Straight, and T.J. Mitchison. 2002. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell.* 3:791–802. doi:10.1016/s1534-5807(02)00366-0.
- Kinoshita, M., S. Kumar, A. Mizoguchi, C. Ide, A. Kinoshita, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, and M. Noda. 1997. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes & Development.* 11:1535–1547. doi:10.1101/gad.11.12.1535.
- Kinoshita, M., and M. Noda. 2001. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Struct. Funct.* 26:667–670. doi:10.1247/csf.26.667.
- Kita, K., T. Wittmann, I.S. Näthke, and C.M. Waterman-Storer. 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. doi:10.1091/mbc.e05-06-0498.
- Klauber, N., S. Parangi, E. Flynn, E. Hamel, and R.J. D'Amato. 1997. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* 57:81–86.

- Klumperman, J., A. Schweizer, H. Clausen, B.L. Tang, W. Hong, V. Oorschot, and H.P. Hauri. 1998. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci.* 111 ( Pt 22):3411–3425.
- Kobayashi, S., K. Tsuchiya, T. Kurokawa, T. Nakagawa, N. Shimada, and Y. Iitaka. 1994. Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. II. Structural elucidation. *J. Antibiot.* 47:703–707. doi:10.7164/antibiotics.47.703.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7. *Cell.* 115:343–354. doi:10.1016/S0092-8674(03)00813-4.
- Komarova, Y., C.O. De Groot, I. Grigoriev, S.M. Gouveia, E.L. Munteanu, J.M. Schober, S. Honnappa, R.M. Buey, C.C. Hoogenraad, M. Dogterom, G.G. Borisy, M.O. Steinmetz, and A. Akhmanova. 2009. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol.* 184:691–706. doi:10.1083/jcb.200807179.
- Komarova, Y.A., A.S. Akhmanova, S.-I. Kojima, N. Galjart, and G.G. Borisy. 2002. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol.* 159:589–599. doi:10.1083/jcb.200208058.
- Kondoh, M., T. Usui, T. Nishikiori, T. Mayumi, and H. Osada. 1999. Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochemical Journal.* 340:411–416. doi:10.1042/bj3400411.
- Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud, and A. Echard. 2006. Rab35 Regulates an Endocytic Recycling Pathway Essential for the Terminal Steps of Cytokinesis. *Current Biology.* 16:1719–1725. doi:10.1016/j.cub.2006.07.020.
- Kremer, B.E., L.A. Adang, and I.G. Macara. 2007. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell.* 130:837–850. doi:10.1016/j.cell.2007.06.053.
- Kremer, B.E., T. Haystead, and I.G. Macara. 2005. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell.* 16:4648–4659. doi:10.1091/mbc.e05-03-0267.
- Kreuziger, L.M.B., J.C. Porcher, R.P. Ketterling, and D.P. Steensma. 2007. An MLL-SEPT9 fusion and t(11;17)(q23;q25) associated with de novo myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research.* 31:1145–1148. doi:10.1016/j.leukres.2006.12.006.
- Krokowski, S., D. Lobato-Márquez, A. Chastanet, P.M. Pereira, D. Angelis, D. Galea, G. Larrouy-Maumus, R. Henriques, E.T. Spiliotis, R. Carballido-López, and S. Mostowy. 2018. Septins Recognize and Entrap Dividing Bacterial Cells for Delivery to Lysosomes. *Cell Host Microbe.* 24:866-874.e4. doi:10.1016/j.chom.2018.11.005.
- Kupchan, S.M., Y. Komoda, W.A. Court, G.J. Thomas, R.M. Smith, A. Karim, C.J. Gilmore, R.C. Haltiwanger, and R.F. Bryan. 1972. Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J Am Chem Soc.* 94:1354–1356. doi:10.1021/ja00759a054.
- Kuriyama, R., C. Gustus, Y. Terada, Y. Uetake, and J. Matuliene. 2002. CHO1, a mammalian kinesin-like protein, interacts with F-actin and is involved in the terminal phase of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 156:783–790. doi:10.1083/jcb.200109090.

- Kwitny, S., A.V. Klaus, and G.R. Hunnicutt. 2010. The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 82:669–678. doi:10.1095/biolreprod.109.079566.
- Laan, L., N. Pavin, J. Husson, G. Romet-Lemonne, M. van Duijn, M.P. López, R.D. Vale, F. Jülicher, S.L. Reck-Peterson, and M. Dogterom. 2012. Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell.* 148:502–514. doi:10.1016/j.cell.2012.01.007.
- Lacroix, B., J. van Dijk, N.D. Gold, J. Guizetti, G. Aldrian-Herrada, K. Rogowski, D.W. Gerlich, and C. Janke. 2010. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *The Journal of Cell Biology.* 189:945–954. doi:10.1083/jcb.201001024.
- Laferrière, N.B., and D.L. Brown. 1996. Expression and posttranslational modification of class III beta-tubulin during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 35:188–199. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:3<188::AID-CM2>3.0.CO;2-5.
- Lau, D.H., L. Xue, L.J. Young, P.A. Burke, and A.T. Cheung. 1999. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* 14:31–36. doi:10.1089/cbr.1999.14.31.
- Lawrence, C.J., R.K. Dawe, K.R. Christie, D.W. Cleveland, S.C. Dawson, S.A. Endow, L.S.B. Goldstein, H.V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R.L. Malmberg, J.R. McIntosh, H. Miki, T.J. Mitchison, Y. Okada, A.S.N. Reddy, W.M. Saxton, M. Schliwa, J.M. Scholey, R.D. Vale, C.E. Walczak, and L. Wordeman. 2004. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol.* 167:19–22. doi:10.1083/jcb.200408113.
- Lawson, C.D., and A.J. Ridley. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* 217:447–457. doi:10.1083/jcb.201612069.
- Lazarus, J.E., A.J. Moughamian, M.K. Tokito, and E.L.F. Holzbaur. 2013. Dynactin subunit p150(Glued) is a neuron-specific anti-catastrophe factor. *PLoS Biol.* 11:e1001611. doi:10.1371/journal.pbio.1001611.
- Lebok, P., M. Öztürk, U. Heilenkötter, F. Jaenicke, V. Müller, P. Paluchowski, S. Geist, C. Wilke, E. Burandt, A. Lebeau, W. Wilczak, T. Krech, R. Simon, G. Sauter, and A. Quaas. 2016. High levels of class III  $\beta$ -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncol Lett.* 11:1987–1994. doi:10.3892/ol.2016.4206.
- Lee, S., and S. Kumar. 2016. Actomyosin stress fiber mechanosensing in 2D and 3D. *F1000Res.* 5:2261. doi:10.12688/f1000research.8800.1.
- Leipe, D.D., Y.I. Wolf, E.V. Koonin, and L. Aravind. 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology.* 317:41–72. doi:10.1006/jmbi.2001.5378.
- Leite, F., and M. Way. 2015. The role of signalling and the cytoskeleton during Vaccinia Virus egress. *Virus Research.* 209:87–99. doi:10.1016/j.virusres.2015.01.024.
- Leo, L., W. Yu, M. D’Rozario, E.A. Waddell, D.R. Marena, M.A. Baird, M.W. Davidson, B. Zhou, B. Wu, L. Baker, D.J. Sharp, and P.W. Baas. 2015. Vertebrate Fidgetin Restrains Axonal Growth by

- Severing Labile Domains of Microtubules. *Cell Rep.* 12:1723–1730. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.017.
- Letort, G., H. Ennomani, L. Gressin, M. Théry, and L. Blanchoin. 2015. Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000Res.* 4. doi:10.12688/f1000research.6374.1.
- Levallet, G., E. Bergot, M. Antoine, C. Creveuil, A.O. Santos, M. Beau-Faller, F. de Fraipont, E. Brambilla, J. Levallet, F. Morin, V. Westeel, M. Wislez, E. Quoix, D. Debieuvre, F. Dubois, I. Rouquette, J.-L. Pujol, D. Moro-Sibilot, J. Camonis, G. Zalcman, and Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT). 2012. High TUBB3 expression, an independent prognostic marker in patients with early non-small cell lung cancer treated by preoperative chemotherapy, is regulated by K-Ras signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.* 11:1203–1213. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0899.
- L'Hernault, S.W., and J.L. Rosenbaum. 1985. Chlamydomonas .alpha.-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the .epsilon.-amino group of a lysine. *Biochemistry.* 24:473–478. doi:10.1021/bi00323a034.
- Lheureux, S., and F. Joly. 2012. Cabazitaxel après docétaxel, une nouvelle option dans le cancer métastatique de la prostate résistant à la castration. *Bulletin du Cancer.* 99:875–880. doi:10.1684/bdc.2012.1617.
- Li, F., X. Zhou, H. Zhou, J. Jia, L. Li, S. Zhai, and B. Yan. 2016. Reducing Both Pgp Overexpression and Drug Efflux with Anti-Cancer Gold-Paclitaxel Nanoconjugates. *PLoS ONE.* 11:e0160042. doi:10.1371/journal.pone.0160042.
- Lin, Z.-Y., and W.-L. Chuang. 2012. Genes responsible for the characteristics of primary cultured invasive phenotype hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 66:454–458. doi:10.1016/j.biopha.2012.04.001.
- Liu, N., Y. Xiong, Y. Ren, L. Zhang, X. He, X. Wang, M. Liu, D. Li, W. Shui, and J. Zhou. 2015. Proteomic Profiling and Functional Characterization of Multiple Post-Translational Modifications of Tubulin. *J Proteome Res.* 14:3292–3304. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00308.
- Liu, Z., Q.P. Vong, C. Liu, and Y. Zheng. 2014. Borg5 is required for angiogenesis by regulating persistent directional migration of the cardiac microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 25:841–851. doi:10.1091/mbc.E13-09-0543.
- López, M.P., F. Huber, I. Grigoriev, M.O. Steinmetz, A. Akhmanova, G.H. Koenderink, and M. Dogterom. 2014. Actin–microtubule coordination at growing microtubule ends. *Nat Commun.* 5:4778. doi:10.1038/ncomms5778.
- Lopus, M., E. Oroudjev, L. Wilson, S. Wilhelm, W. Widdison, R. Chari, and M.A. Jordan. 2010. Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol Cancer Ther.* 9:2689–2699. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0644.
- Lord, C., S. Ferro-Novick, and E.A. Miller. 2013. The Highly Conserved COPII Coat Complex Sorts Cargo from the Endoplasmic Reticulum and Targets It to the Golgi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 5:a013367–a013367. doi:10.1101/cshperspect.a013367.
- Low, C., and I.G. Macara. 2006. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. *J. Biol. Chem.* 281:30697–30706. doi:10.1074/jbc.M605179200.

- Lowe, M. 2005. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*. 6:711–719. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00311.x.
- Ludueña, R.F. 2013. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol*. 302:41–185. doi:10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9.
- Ludueña, R.F., and A. Banerjee. 2008. The Isoforms of Tubulin. In *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. T. Fojo, editor. Humana Press, Totowa, NJ. 123–175.
- Luedeke, C., S.B. Frei, I. Sbalzarini, H. Schwarz, A. Spang, and Y. Barral. 2005. Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *J Cell Biol*. 169:897–908. doi:10.1083/jcb.200412143.
- Ma, Z., K.S. Lau, W.L. Law, and W.K. Leung. 2017. Comparison of Methylated Septin 9 with Carcinoembryonic Antigen in Monitoring of Colorectal Cancer Patients After Curative Surgery. *Gastroenterology*. 152:S1022. doi:10.1016/S0016-5085(17)33460-1.
- Madhivanan, K., and R.C. Aguilar. 2014. Ciliopathies: the trafficking connection. *Traffic*. 15:1031–1056. doi:10.1111/tra.12195.
- Magiera, M.M., S. Bodakuntla, J. Žiak, S. Lacomme, P. Marques Sousa, S. Leboucher, T.J. Hausrat, C. Bosc, A. Andrieux, M. Kneussel, M. Landry, A. Calas, M. Balastik, and C. Janke. 2018. Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *EMBO J*. 37. doi:10.15252/embj.2018100440.
- Maloney, S.M., C.A. Hoover, L.V. Morejon-Lasso, and J.R. Prospero. 2020. Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers (Basel)*. 12. doi:10.3390/cancers12113323.
- Mandon, E.C., S.F. Trueman, and R. Gilmore. 2013. Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5. doi:10.1101/cshperspect.a013342.
- Manna, T., D. Thrower, H.P. Miller, P. Curmi, and L. Wilson. 2006. Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro. *J. Biol. Chem*. 281:2071–2078. doi:10.1074/jbc.M510661200.
- Marceiller, J., A. Drechou, G. Durand, F. Perez, and C. Poüs. 2005. Kinesin is involved in protecting nascent microtubules from disassembly after recovery from nocodazole treatment. *Experimental Cell Research*. 304:483–492. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.007.
- Marcus, E.A., E. Tokhtaeva, S. Turdikulova, J. Capri, J.P. Whitelegge, D.R. Scott, G. Sachs, F. Berditchevski, and O. Vagin. 2016. Septin oligomerization regulates persistent expression of ErbB2/HER2 in gastric cancer cells. *Biochem J*. 473:1703–1718. doi:10.1042/BCJ20160203.
- Marcus, J., M. Bejerano-Sagie, N. Patterson, S. Bagchi, V.V. Verkhusha, D. Connolly, G.L. Goldberg, A. Golden, V.P. Sharma, J. Condeelis, and C. Montagna. 2019. Septin 9 isoforms promote tumorigenesis in mammary epithelial cells by increasing migration and ECM degradation through metalloproteinase secretion at focal adhesions. *Oncogene*. 38:5839–5859. doi:10.1038/s41388-019-0844-0.
- Margaron, Y., N. Fradet, and J.-F. Côté. 2013. ELMO recruits actin cross-linking family 7 (ACF7) at the cell membrane for microtubule capture and stabilization of cellular protrusions. *J. Biol. Chem*. 288:1184–1199. doi:10.1074/jbc.M112.431825.

- Margolis, R.L., and L. Wilson. 1981. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature*. 293:705–711. doi:10.1038/293705a0.
- Margolis, R.L., and L. Wilson. 1998. Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays*. 20:830–836. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199810)20:10<830::AID-BIES8>3.0.CO;2-N.
- Martinelli, E., A. Fattorossi, A. Battaglia, M. Petrillo, G. Raspaglio, G.F. Zannoni, M. Fanelli, D. Gallo, and G. Scambia. 2018. Preoperative Anti-Class III  $\beta$ -Tubulin Antibodies As Relevant Clinical Biomarkers in Ovarian Cancer. *Translational Oncology*. 11:358–365. doi:10.1016/j.tranon.2018.01.016.
- Martínez, C., J. Corral, J.A. Dent, L. Sesma, V. Vicente, and J. Ware. 2006. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. *J. Thromb. Haemost.* 4:1388–1395. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01952.x.
- Martínez, C., M.A. Sanjuan, J.A. Dent, L. Karlsson, and J. Ware. 2004. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochem. J.* 382:783–791. doi:10.1042/BJ20040372.
- Masson, D., and T.E. Kreis. 1993. Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J Cell Biol.* 123:357–371. doi:10.1083/jcb.123.2.357.
- Matanis, T., A. Akhmanova, P. Wulf, E. Del Nery, T. Weide, T. Stepanova, N. Galjart, F. Grosveld, B. Goud, C.I. De Zeeuw, A. Barnekow, and C.C. Hoogenraad. 2002. Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi–ER transport by recruiting the dynein–dynactin motor complex. *Nat Cell Biol.* 4:986–992. doi:10.1038/ncb891.
- Matsushima, K., K. Tokuraku, M.R. Hasan, and S. Kotani. 2012. Microtubule-associated protein 4 binds to actin filaments and modulates their properties. *J. Biochem.* 151:99–108. doi:10.1093/jb/mvr119.
- Maurer, S.P., P. Bieling, J. Cope, A. Hoenger, and T. Surrey. 2011. GTP $\gamma$ S microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:3988–3993. doi:10.1073/pnas.1014758108.
- Mavrikakis, M., Y. Azou-Gros, F.-C. Tsai, J. Alvarado, A. Bertin, F. Iv, A. Kress, S. Basselet, G.H. Koenderink, and T. Lecuit. 2014. Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat. Cell Biol.* 16:322–334. doi:10.1038/ncb2921.
- McMurray, M.A., and J. Thorner. 2009. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div.* 4:18. doi:10.1186/1747-1028-4-18.
- McMurray, M.A., and J. Thorner. 2019. Turning it inside out: The organization of human septin heterooligomers. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 76:449–456. doi:10.1002/cm.21571.
- McNally, F.J., and R.D. Vale. 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*. 75:419–429. doi:10.1016/0092-8674(93)90377-3.
- Melki, R., S. Fievez, and M.F. Carlier. 1996. Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine



- ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry*. 35:12038–12045. doi:10.1021/bi961325o.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:575–625. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.575.
- Mendonça, D.C., J.N. Macedo, S.L. Guimarães, F.L. Barroso da Silva, A. Cassago, R.C. Garratt, R.V. Portugal, and A.P.U. Araujo. 2019. A revised order of subunits in mammalian septin complexes. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 76:457–466. doi:10.1002/cm.21569.
- Menzin, A.W., S.A. King, J.K. Aikins, J.J. Mikuta, and S.C. Rubin. 1994. Taxol (paclitaxel) was approved by FDA for the treatment of patients with recurrent ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 54:103.
- Meseroll, R.A., P. Occhipinti, and A.S. Gladfelter. 2013. Septin phosphorylation and coiled-coil domains function in cell and septin ring morphology in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Eukaryotic Cell*. 12:182–193. doi:10.1128/EC.00251-12.
- Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature*. 484:120–124. doi:10.1038/nature10914.
- Meunier, S., and I. Vernos. 2012. Microtubule assembly during mitosis – from distinct origins to distinct functions? *J Cell Sci*. 125:2805–2814. doi:10.1242/jcs.092429.
- Meunier, S., and I. Vernos. 2016. Acentrosomal Microtubule Assembly in Mitosis: The Where, When, and How. *Trends in Cell Biology*. 26:80–87. doi:10.1016/j.tcb.2015.09.001.
- Mierzwa, B., and D.W. Gerlich. 2014. Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev Cell*. 31:525–538. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.006.
- Miki, H., M. Setou, K. Kaneshiro, and N. Hirokawa. 2001. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:7004–7011. doi:10.1073/pnas.111145398.
- Miller, P.M., A.W. Folkmann, A.R.R. Maia, N. Efimova, A. Efimov, and I. Kaverina. 2009. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol*. 11:1069–1080. doi:10.1038/ncb1920.
- Mishima, M., R. Maesaki, M. Kasa, T. Watanabe, M. Fukata, K. Kaibuchi, and T. Hakoshima. 2007. Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:10346–10351. doi:10.1073/pnas.0703876104.
- Mitchell, L., A. Lau, J.-P. Lambert, H. Zhou, Y. Fong, J.-F. Couture, D. Figeys, and K. Baetz. 2011. Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS ONE*. 6:e25336. doi:10.1371/journal.pone.0025336.
- Mitchison, T.J. 1989. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol*. 109:637–652. doi:10.1083/jcb.109.2.637.
- Mizutani, Y., H. Ito, I. Iwamoto, R. Morishita, H. Kanoh, M. Seishima, and K. Nagata. 2013. Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. *Biol. Chem*. 394:281–290. doi:10.1515/hsz-2012-0258.

- Molina, A., L. Velot, L. Ghouinem, M. Abdelkarim, B.P. Bouchet, A.-C. Luissint, I. Bouhleb, M. Morel, E. Sapharikas, A. Di Tommaso, S. Honoré, D. Braguer, N. Gruel, A. Vincent-Salomon, O. Delattre, B. Sigal-Zafrani, F. André, B. Terris, A. Akhmanova, M. Di Benedetto, C. Nahmias, and S. Rodrigues-Ferreira. 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.
- Monroy, B.Y., D.L. Sawyer, B.E. Ackermann, M.M. Borden, T.C. Tan, and K.M. Ori-McKenney. 2018. Competition between microtubule-associated proteins directs motor transport. *Nat Commun.* 9:1487. doi:10.1038/s41467-018-03909-2.
- Montagna, C., M.-S. Lyu, K. Hunter, L. Lukes, W. Lowther, T. Reppert, B. Hissong, Z. Weaver, and T. Ried. 2003. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 63:2179–2187.
- Mooberry, S.L., G. Tien, A.H. Hernandez, A. Plubrukarn, and B.S. Davidson. 1999. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res.* 59:653–660.
- Mostowy, S., M. Bonazzi, M.A. Hamon, T.N. Tham, A. Mallet, M. Lelek, E. Gouin, C. Demangel, R. Brosch, C. Zimmer, A. Sartori, M. Kinoshita, M. Lecuit, and P. Cossart. 2010. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe.* 8:433–444. doi:10.1016/j.chom.2010.10.009.
- Mostowy, S., and P. Cossart. 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:183–194. doi:10.1038/nrm3284.
- Mostowy, S., S. Janel, C. Forestier, C. Roduit, S. Kasas, J. Pizarro-Cerdá, P. Cossart, and F. Lafont. 2011. A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InlB and the Met receptor. *Biophys. J.* 100:1949–1959. doi:10.1016/j.bpj.2011.02.040.
- Mukherjee, S., J.D. Diaz Valencia, S. Stewman, J. Metz, S. Monnier, U. Rath, A.B. Asenjo, R.A. Charafeddine, H.J. Sosa, J.L. Ross, A. Ma, and D.J. Sharp. 2012. Human Fidgetin is a microtubule severing enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle.* 11:2359–2366. doi:10.4161/cc.20849.
- Müller, M.T., R. Schempp, A. Lutz, T. Felder, E. Felder, and P. Miklavc. 2019. Interaction of microtubules and actin during the post-fusion phase of exocytosis. *Sci Rep.* 9:11973. doi:10.1038/s41598-019-47741-0.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6181–6186. doi:10.1073/pnas.95.11.6181.
- Murrell, M.P., and M.L. Gardel. 2012. F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109:20820–20825. doi:10.1073/pnas.1214753109.
- Murtagh, J., H. Lu, and E.L. Schwartz. 2006. Taxotere-Induced Inhibition of Human Endothelial Cell Migration Is a Result of Heat Shock Protein 90 Degradation. *Cancer Res.* 66:8192–8199. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0748.

- Nadkarni, A.V., and W.M. Brieher. 2014. Aip1 destabilizes cofilin-saturated actin filaments by severing and accelerating monomer dissociation from ends. *Curr. Biol.* 24:2749–2757. doi:10.1016/j.cub.2014.09.048.
- Nagata, K., T. Asano, Y. Nozawa, and M. Inagaki. 2004. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *J. Biol. Chem.* 279:55895–55904. doi:10.1074/jbc.M406153200.
- Nagata, K.-I., A. Kawajiri, S. Matsui, M. Takagishi, T. Shiromizu, N. Saitoh, I. Izawa, T. Kiyono, T.J. Itoh, H. Hotani, and M. Inagaki. 2003. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.* 278:18538–18543. doi:10.1074/jbc.M205246200.
- Nakos, K., M.R. Radler, and E.T. Spiliotis. 2019a. Septin 2/6/7 complexes tune microtubule plus-end growth and EB1 binding in a concentration- and filament-dependent manner. *Mol. Biol. Cell.* 30:2913–2928. doi:10.1091/mbc.E19-07-0362.
- Nakos, K., M. Rosenberg, and E.T. Spiliotis. 2019b. Regulation of microtubule plus end dynamics by septin 9. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 76:83–91. doi:10.1002/cm.21488.
- Nalbant, P., L. Hodgson, V. Kraynov, A. Touthkine, and K.M. Hahn. 2004. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science*. 305:1615–1619. doi:10.1126/science.1100367.
- Naz, F., F. Anjum, A. Islam, F. Ahmad, and M.I. Hassan. 2013. Microtubule affinity-regulating kinase 4: structure, function, and regulation. *Cell Biochem. Biophys.* 67:485–499. doi:10.1007/s12013-013-9550-7.
- Nguyen, H.L., S. Chari, D. Gruber, C.M. Lue, S.J. Chapin, and J.C. Bulinski. 1997. Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 2):281–294.
- Nie, W., M. Xu, L. Gan, H. Huang, Q. Xiu, and B. Li. 2015. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lab. Invest.* 95:56–64. doi:10.1038/labinvest.2014.124.
- Nieuwenhuis, J., A. Adamopoulos, O.B. Bleijerveld, A. Mazouzi, E. Stickel, P. Celie, M. Altelaar, P. Knipscheer, A. Perrakis, V.A. Blomen, and T.R. Brummelkamp. 2017. Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science*. 358:1453–1456. doi:10.1126/science.aao5676.
- Nishihama, R., M. Onishi, and J.R. Pringle. 2011. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biol. Chem.* 392:681–687. doi:10.1515/BC.2011.086.
- Nogales, E., M. Whittaker, R.A. Milligan, and K.H. Downing. 1999. High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell*. 96:79–88. doi:10.1016/S0092-8674(00)80961-7.
- Nölke, T., C. Schwan, F. Lehmann, K. Østevold, O. Pertz, and K. Aktories. 2016. Septins guide microtubule protrusions induced by actin-depolymerizing toxins like *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113:7870–7875. doi:10.1073/pnas.1522717113.
- Nonaka, S., H. Naoki, and S. Ishii. 2011. A multiphysical model of cell migration integrating reaction-diffusion, membrane and cytoskeleton. *Neural Netw.* 24:979–989. doi:10.1016/j.neunet.2011.06.009.

- North, B.J., B.L. Marshall, M.T. Borra, J.M. Denu, and E. Verdin. 2003. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD<sup>+</sup>-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell*. 11:437–444. doi:10.1016/S1097-2765(03)00038-8.
- Nouet, S., N. Amzallag, J.-M. Li, S. Louis, I. Seitz, T.-X. Cui, A.-M. Alleaume, M. Di Benedetto, C. Boden, M. Masson, A.D. Strosberg, M. Horiuchi, P.-O. Couraud, and C. Nahmias. 2004. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem*. 279:28989–28997. doi:10.1074/jbc.M403880200.
- Oakley, B.R., V. Paolillo, and Y. Zheng. 2015.  $\gamma$ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. *Mol. Biol. Cell*. 26:2957–2962. doi:10.1091/mbc.E14-11-1514.
- Odde, D.J., L. Cassimeris, and H.M. Buettner. 1995. Kinetics of microtubule catastrophe assessed by probabilistic analysis. *Biophys. J*. 69:796–802. doi:10.1016/S0006-3495(95)79953-2.
- Oegema, K., A. Desai, M. Lie Wong, T.J. Mitchison, and C.M. Field. 1998. [23] Purification and assay of a septin complex from *Drosophila* embryos. *In Methods in Enzymology*. Elsevier. 279–295.
- Ohishi, Y., Y. Oda, Y. Basaki, H. Kobayashi, N. Wake, M. Kuwano, and M. Tsuneyoshi. 2007. Expression of beta-tubulin isoforms in human primary ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol*. 105:586–592. doi:10.1016/j.ygyno.2007.01.044.
- Okada, S., M. Leda, J. Hanna, N.S. Savage, E. Bi, and A.B. Goryachev. 2013. Daughter Cell Identity Emerges from the Interplay of Cdc42, Septins, and Exocytosis. *Developmental Cell*. 26:148–161. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.015.
- Olenick, M.A., and E.L.F. Holzbaur. 2019. Dynein activators and adaptors at a glance. *J Cell Sci*. 132:jcs227132. doi:10.1242/jcs.227132.
- Omrane, M., A.S. Camara, C. Taveneau, N. Benzoubir, T. Tubiana, J. Yu, R. Guérois, D. Samuel, B. Goud, C. Poüs, S. Bressanelli, R.C. Garratt, A.R. Thiam, and A. Gassama-Diagne. 2019. Septin 9 has Two Polybasic Domains Critical to Septin Filament Assembly and Golgi Integrity. *iScience*. 13:138–153. doi:10.1016/j.isci.2019.02.015.
- Ono, R., T. Taki, T. Taketani, H. Kawaguchi, M. Taniwaki, T. Okamura, K. Kawa, R. Hanada, M. Kobayashi, and Y. Hayashi. 2002. SEPTIN6, a human homologue to mouse Septin6, is fused to MLL in infant acute myeloid leukemia with complex chromosomal abnormalities involving 11q23 and Xq24. *Cancer Res*. 62:333–337.
- Ookata, K., S. Hisanaga, J.C. Bulinski, H. Murofushi, H. Aizawa, T.J. Itoh, H. Hotani, E. Okumura, K. Tachibana, and T. Kishimoto. 1995. Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol*. 128:849–862. doi:10.1083/jcb.128.5.849.
- Orlando, K., J. Zhang, X. Zhang, P. Yue, T. Chiang, E. Bi, and W. Guo. 2008. Regulation of Gic2 localization and function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate during the establishment of cell polarity in budding yeast. *J. Biol. Chem*. 283:14205–14212. doi:10.1074/jbc.M708178200.
- Orr, G.A., P. Verdier-Pinard, H. McDaid, and S.B. Horwitz. 2003. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 22:7280–7295. doi:10.1038/sj.onc.1206934.

- Osaka, M., J.D. Rowley, and N.J. Zeleznik-Le. 1999. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:6428–6433. doi:10.1073/pnas.96.11.6428.
- Ozols, R.F., B.N. Bundy, B.E. Greer, J.M. Fowler, D. Clarke-Pearson, R.A. Burger, R.S. Mannel, K. DeGeest, E.M. Hartenbach, and R. Baergen. 2003. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *JCO.* 21:3194–3200. doi:10.1200/JCO.2003.02.153.
- Pampaloni, F., and E.-L. Florin. 2008. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* 26:302–310. doi:10.1016/j.tibtech.2008.03.002.
- Pamula, M.C., S.-C. Ti, and T.M. Kapoor. 2016. The structured core of human  $\beta$  tubulin confers isotype-specific polymerization properties. *J. Cell Biol.* 213:425–433. doi:10.1083/jcb.201603050.
- Pan, F., R.L. Malmberg, and M. Momany. 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* 7:103. doi:10.1186/1471-2148-7-103.
- Panda, D., H.P. Miller, A. Banerjee, R.F. Ludueña, and L. Wilson. 1994. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:11358–11362. doi:10.1073/pnas.91.24.11358.
- Pantaloni, D., and M.F. Carlier. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75:1007–1014. doi:10.1016/0092-8674(93)90544-z.
- Patasi, C., J. Godočíková, S. Michlíková, Y. Nie, R. Káčeriková, K. Kválová, S. Raunser, and M. Farkašovský. 2015. The role of Bni5 in the regulation of septin higher-order structure formation. *Biol. Chem.* 396:1325–1337. doi:10.1515/hsz-2015-0165.
- Peñalva, M.A., J. Zhang, X. Xiang, and A. Pantazopoulou. 2017. Transport of fungal RAB11 secretory vesicles involves myosin-5, dynein/dynactin/p25, and kinesin-1 and is independent of kinesin-3. *Mol. Biol. Cell.* 28:947–961. doi:10.1091/mbc.E16-08-0566.
- Pennington, K., C.L. Beasley, P. Dicker, A. Fagan, J. English, C.M. Pariante, R. Wait, M.J. Dunn, and D.R. Cotter. 2008. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 13:1102–1117. doi:10.1038/sj.mp.4002098.
- Perdiz, D., R. Mackeh, C. Poüs, and A. Baillet. 2011. The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell. Signal.* 23:763–771. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.014.
- Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 96:517–527. doi:10.1016/s0092-8674(00)80656-x.
- Peris, L., M. Thery, J. Fauré, Y. Saoudi, L. Lafanechère, J.K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, and D. Job. 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *Journal of Cell Biology.* 174:839–849. doi:10.1083/jcb.200512058.

- Peris, L., M. Wagenbach, L. Lafanechère, J. Brocard, A.T. Moore, F. Kozielski, D. Job, L. Wordeman, and A. Andrieux. 2009. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *The Journal of Cell Biology*. 185:1159–1166. doi:10.1083/jcb.200902142.
- Person, F., W. Wilczak, C. Hube-Magg, C. Burdelski, C. Möller-Koop, R. Simon, M. Noriega, G. Sauter, S. Steurer, S. Burdak-Rothkamm, and F. Jacobsen. 2017. Prevalence of  $\beta$ III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. *Tumour Biol*. 39:1010428317712166. doi:10.1177/1010428317712166.
- Peterson, E.A., and E.M. Petty. 2010. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin. Genet*. 77:511–524. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01392.x.
- Petry, S., A.C. Groen, K. Ishihara, T.J. Mitchison, and R.D. Vale. 2013. Branching microtubule nucleation in *Xenopus* egg extracts mediated by augmin and TPX2. *Cell*. 152:768–777. doi:10.1016/j.cell.2012.12.044.
- Pfanzelter, J., S. Mostowy, and M. Way. 2018. Septins suppress the release of vaccinia virus from infected cells. *Journal of Cell Biology*. 217:2911–2929. doi:10.1083/jcb.201708091.
- Piatti, S. 2020. Cytokinesis: An Anillin–RhoGEF Module Sets the Stage for Septin Double Ring Assembly. *Current Biology*. 30:R347–R349. doi:10.1016/j.cub.2020.02.035.
- Piccart, M.J., and F. Cardoso. 2003. Progress in systemic therapy for breast cancer: an overview and perspectives. *European Journal of Cancer Supplements*. 1:56–69. doi:10.1016/S1359-6349(03)00009-0.
- Plastino, J., and L. Blanchoin. 2019. Dynamic stability of the actin ecosystem. *J Cell Sci*. 132:jcs219832. doi:10.1242/jcs.219832.
- Pletjushkina, O.J., O.J. Ivanova, I.N. Kaverina, and J.M. Vasiliev. 1994. Taxol-treated fibroblasts acquire an epithelioid shape and a circular pattern of actin bundles. *Exp Cell Res*. 212:201–208. doi:10.1006/excr.1994.1135.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 29:545–576. doi:10.1146/annurev.biophys.29.1.545.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453–465. doi:10.1016/s0092-8674(03)00120-x.
- Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial, and A. Spang. 2010. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*. 141:497–508. doi:10.1016/j.cell.2010.03.011.
- Pourroy, B., S. Honoré, E. Pasquier, V. Bourgarel-Rey, A. Kruczynski, C. Briand, and D. Braguer. 2006. Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells. *Cancer Res*. 66:3256–3263. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3885.
- Pringle, J.R. 2008. Origins and Development of the Septin Field. In *The Septins*. P.A. Hall, S.E.H. Russell, and J.R. Pringle, editors. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 5–34.

- Prota, A.E., K. Bargsten, P.T. Northcote, M. Marsh, K.-H. Altmann, J.H. Miller, J.F. Díaz, and M.O. Steinmetz. 2014. Structural Basis of Microtubule Stabilization by Laulimalide and Peloruside A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53:1621–1625. doi:10.1002/anie.201307749.
- Prota, A.E., M.M. Magiera, M. Kuijpers, K. Bargsten, D. Frey, M. Wieser, R. Jaussi, C.C. Hoogenraad, R.A. Kammerer, C. Janke, and M.O. Steinmetz. 2013. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *The Journal of Cell Biology.* 200:259–270. doi:10.1083/jcb.201211017.
- Prota, A.E., J. Setter, A.B. Waight, K. Bargsten, J. Murga, J.F. Díaz, and M.O. Steinmetz. 2016. Pironetin Binds Covalently to  $\alpha$ Cys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of  $\alpha$ -Tubulin to Inhibit Microtubule Formation. *Journal of Molecular Biology.* 428:2981–2988. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.023.
- Pryor, D.E., A. O’Brate, G. Bilcer, J.F. Díaz, Y. Wang, Y. Wang, M. Kabaki, M.K. Jung, J.M. Andreu, A.K. Ghosh, P. Giannakakou, and E. Hamel. 2002. The Microtubule Stabilizing Agent Laulimalide Does Not Bind in the Taxoid Site, Kills Cells Resistant to Paclitaxel and Epothilones, and May Not Require Its Epoxide Moiety for Activity<sup>†</sup>. *Biochemistry.* 41:9109–9115. doi:10.1021/bi020211b.
- Puls, A., A.G. Eliopoulos, C.D. Nobes, T. Bridges, L.S. Young, and A. Hall. 1999. Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF( $\alpha$ ) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell. Sci.* 112 ( Pt 17):2983–2992.
- Rai, A., S. Kapoor, S. Singh, B.P. Chatterji, and D. Panda. 2015. Transcription factor NF- $\kappa$ B associates with microtubules and stimulates apoptosis in response to suppression of microtubule dynamics in MCF-7 cells. *Biochemical Pharmacology.* 93:277–289. doi:10.1016/j.bcp.2014.12.007.
- Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458:445–452. doi:10.1038/nature07961.
- Rao, S., G.A. Orr, A.G. Chaudhary, D.G. Kingston, and S.B. Horwitz. 1995. Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin. *J. Biol. Chem.* 270:20235–20238. doi:10.1074/jbc.270.35.20235.
- Ravelli, R.B.G., B. Gigant, P.A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, and M. Knossow. 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature.* 428:198–202. doi:10.1038/nature02393.
- Raybin, D., and M. Flavin. 1975. An enzyme tyrosylating  $\alpha$ -tubulin and its role in microtubule assembly. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 65:1088–1095. doi:10.1016/S0006-291X(75)80497-9.
- Redwine, W.B., M.E. DeSantis, I. Hollyer, Z.M. Htet, P.T. Tran, S.K. Swanson, L. Florens, M.P. Washburn, and S.L. Reck-Peterson. 2017. The human cytoplasmic dynein interactome reveals novel activators of motility. *Elife.* 6. doi:10.7554/eLife.28257.
- Regnard, C. 2003. Characterisation of PGs1, a subunit of a protein complex co-purifying with tubulin polyglutamylase. *Journal of Cell Science.* 116:4181–4190. doi:10.1242/jcs.00743.
- Reilein, A., and W.J. Nelson. 2005. APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat Cell Biol.* 7:463–473. doi:10.1038/ncb1248.

- Reilly, M.L., and A. Benmerah. 2019. Ciliary kinesins beyond IFT: Cilium length, disassembly, cargo transport and signalling. *Biol Cell*. 111:79–94. doi:10.1111/boc.201800074.
- Remillard, S., L.I. Rebhun, G.A. Howie, and S.M. Kupchan. 1975. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science*. 189:1002–1005. doi:10.1126/science.1241159.
- Ren, X., B. Zhao, H. Chang, M. Xiao, Y. Wu, and Y. Liu. 2018. Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells. *Mol Med Report*. doi:10.3892/mmr.2018.8868.
- Ren, Y., J. Zhao, and J. Feng. 2003. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J. Neurosci*. 23:3316–3324.
- Renthal, R., B.G. Schneider, M.M. Miller, and R.F. Ludueña. 1993. Beta IV is the major beta-tubulin isotype in bovine cilia. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 25:19–29. doi:10.1002/cm.970250104.
- Ribet, D., S. Boscaini, C. Cauvin, M. Siguier, S. Mostowy, A. Echard, and P. Cossart. 2017. SUMOylation of human septins is critical for septin filament bundling and cytokinesis. *J. Cell Biol*. 216:4041–4052. doi:10.1083/jcb.201703096.
- Rice, L.M., E.A. Montabana, and D.A. Agard. 2008. The lattice as allosteric effector: structural studies of alphabeta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:5378–5383. doi:10.1073/pnas.0801155105.
- Rivera, E., and H. Gomez. 2010. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone. *Breast Cancer Res*. 12 Suppl 2:S2. doi:10.1186/bcr2573.
- Rivero, S., J. Cardenas, M. Bornens, and R.M. Rios. 2009. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J*. 28:1016–1028. doi:10.1038/emboj.2009.47.
- Rodi, D.J., R.W. Janes, H.J. Sanganeer, R.A. Holton, B.A. Wallace, and L. Makowski. 1999. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human bcl-2 as a taxol-binding protein. *J. Mol. Biol*. 285:197–203. doi:10.1006/jmbi.1998.2303.
- Rodionov, V., J. Yi, A. Kashina, A. Oladipo, and S.P. Gross. 2003. Switching between microtubule- and actin-based transport systems in melanophores is controlled by cAMP levels. *Curr Biol*. 13:1837–1847. doi:10.1016/j.cub.2003.10.027.
- Rodionov, V.I., and G.G. Borisy. 1997. Microtubule treadmilling in vivo. *Science*. 275:215–218. doi:10.1126/science.275.5297.215.
- Rodrigues-Ferreira, S., A. Di Tommaso, A. Dimitrov, S. Cazaubon, N. Gruel, H. Colasson, A. Nicolas, N. Chaverot, V. Molinié, F. Reyat, B. Sigal-Zafrani, B. Terris, O. Delattre, F. Radvanyi, F. Perez, A. Vincent-Salomon, and C. Nahmias. 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.
- Rodrigues-Ferreira, S., H. Moindjie, M.M. Haykal, and C. Nahmias. 2020. Predicting and Overcoming Taxane Chemoresistance. *Trends Mol Med*. doi:10.1016/j.molmed.2020.09.007.
- Rodrigues-Ferreira, S., A. Nehlig, H. Moindjie, C. Monchecourt, C. Seiler, E. Marangoni, S. Chateau-Joubert, M.-E. Dujaric, N. Servant, B. Asselain, P. de Cremoux, M. Lacroix-Triki, M. Arnedos,



- J.-Y. Pierga, F. André, and C. Nahmias. 2019. Improving breast cancer sensitivity to paclitaxel by increasing aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 116:23691–23697. doi:10.1073/pnas.1910824116.
- Rogowski, K., F. Juge, J. van Dijk, D. Wloga, J.-M. Strub, N. Levilliers, D. Thomas, M.-H. Bré, A. Van Dorsselaer, J. Gaertig, and C. Janke. 2009. Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation. *Cell*. 137:1076–1087. doi:10.1016/j.cell.2009.05.020.
- Roll-Mecak, A., and R.D. Vale. 2008. Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature*. 451:363–367. doi:10.1038/nature06482.
- Rosas-Acosta, G., W.K. Russell, A. Deyrieux, D.H. Russell, and V.G. Wilson. 2005. A Universal Strategy for Proteomic Studies of SUMO and Other Ubiquitin-like Modifiers. *Mol Cell Proteomics*. 4:56–72. doi:10.1074/mcp.M400149-MCP200.
- Rowinsky, E.K., and E. Calvo. 2006. Novel agents that target tubulin and related elements. *Semin Oncol*. 33:421–435. doi:10.1053/j.seminoncol.2006.04.006.
- Rowinsky, E.K., and R.C. Donehower. 1995. Paclitaxel (taxol). *N. Engl. J. Med*. 332:1004–1014. doi:10.1056/NEJM199504133321507.
- Russell, S.E., M.A. McIlhatton, J.F. Burrows, P.G. Donaghy, S. Chanduloy, E.M. Petty, L.M. Kalikin, S.W. Church, S. McIlroy, D.P. Harkin, G.W. Keilty, A.N. Cranston, J. Weissenbach, I. Hickey, and P.G. Johnston. 2000. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res*. 60:4729–4734.
- Russell, S.E.H., and P.A. Hall. 2011. Septin genomics: a road less travelled. *Biological Chemistry*. 392:763–767. doi:10.1515/BC.2011.079.
- Sadian, Y., C. Gatsogiannis, C. Patasi, O. Hofnagel, R.S. Goody, M. Farkasovský, and S. Raunser. 2013. The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. *Elife*. 2:e01085. doi:10.7554/eLife.01085.
- Sainath, R., and M. Granato. 2013. Plexin A3 and Turnout Regulate Motor Axonal Branch Morphogenesis in Zebrafish. *PLoS ONE*. 8:e54071. doi:10.1371/journal.pone.0054071.
- Sakamoto, T., A. Uezu, S. Kawauchi, T. Kuramoto, K. Makino, K. Umeda, N. Araki, H. Baba, and H. Nakanishi. 2008. Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain. *Genes Cells*. 13:295–312. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01175.x.
- Sampathkumar, A., J.J. Lindeboom, S. Debolt, R. Gutierrez, D.W. Ehrhardt, T. Ketelaar, and S. Persson. 2011. Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23:2302–2313. doi:10.1105/tpc.111.087940.
- Sanchez, A.D., and J.L. Feldman. 2017. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Curr. Opin. Cell Biol*. 44:93–101. doi:10.1016/j.jceb.2016.09.003.
- Sandoval, I.V., J.S. Bonifacino, R.D. Klausner, M. Henkart, and J. Wehland. 1984. Role of microtubules in the organization and localization of the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 99:113s–118s. doi:10.1083/jcb.99.1.113s.
- Sandrock, K., I. Bartsch, S. Bläser, A. Busse, E. Busse, and B. Zieger. 2011. Characterization of human septin interactions. *Biol. Chem*. 392:751–761. doi:10.1515/BC.2011.081.

- Saraste, M., P.R. Sibbald, and A. Wittinghofer. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15:430–434. doi:10.1016/0968-0004(90)90281-f.
- Sato, Y., K. Hayashi, Y. Amano, M. Takahashi, S. Yonemura, I. Hayashi, H. Hirose, S. Ohno, and A. Suzuki. 2014. MTCL1 crosslinks and stabilizes non-centrosomal microtubules on the Golgi membrane. *Nat Commun.* 5:5266. doi:10.1038/ncomms6266.
- Sauvanet, C., J. Wayt, T. Pelaseyed, and A. Bretscher. 2015. Structure, regulation, and functional diversity of microvilli on the apical domain of epithelial cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31:593–621. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125234.
- Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 277:665–667. doi:10.1038/277665a0.
- Schiff, P.B., and S.B. Horwitz. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1561–1565. doi:10.1073/pnas.77.3.1561.
- Schmidt, M., A. Varma, T. Drgon, B. Bowers, and E. Cabib. 2003. Septins, under Cla4p regulation, and the chitin ring are required for neck integrity in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 14:2128–2141. doi:10.1091/mbc.e02-08-0547.
- Schneider, R., and S. Persson. 2015. Connecting two arrays: the emerging role of actin-microtubule cross-linking motor proteins. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00415.
- Schuh, A.L., and A. Audhya. 2014. The ESCRT machinery: from the plasma membrane to endosomes and back again. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49:242–261. doi:10.3109/10409238.2014.881777.
- Scrofani, J., T. Sardon, S. Meunier, and I. Vernos. 2015. Microtubule nucleation in mitosis by a RanGTP-dependent protein complex. *Curr Biol.* 25:131–140. doi:10.1016/j.cub.2014.11.025.
- Sellin, M.E., L. Sandblad, S. Stenmark, and M. Gullberg. 2011. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol. Biol. Cell.* 22:3152–3164. doi:10.1091/mbc.E11-03-0253.
- Sellin, M.E., S. Stenmark, and M. Gullberg. 2012. Mammalian SEPT9 isoforms direct microtubule-dependent arrangements of septin core heteromers. *Mol. Biol. Cell.* 23:4242–4255. doi:10.1091/mbc.E12-06-0486.
- Serra-Marques, A., M. Martin, E.A. Katrukha, I. Grigoriev, C.A. Peeters, Q. Liu, P.J. Hooikaas, Y. Yao, V. Solianova, I. Smal, L.B. Pedersen, E. Meijering, L.C. Kapitein, and A. Akhmanova. 2020. Concerted action of kinesins KIF5B and KIF13B promotes efficient secretory vesicle transport to microtubule plus ends. *eLife.* 9:e61302. doi:10.7554/eLife.61302.
- Shankar, J., A. Messenberg, J. Chan, T.M. Underhill, L.J. Foster, and I.R. Nabi. 2010. Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *Cancer Res.* 70:3780–3790. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4439.
- Sharp, D.J., and J.L. Ross. 2012. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *Journal of Cell Science.* 125:2561–2569. doi:10.1242/jcs.101139.
- Shcheprova, Z., S. Baldi, S.B. Frei, G. Gonnet, and Y. Barral. 2008. A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature.* 454:728–734. doi:10.1038/nature07212.

- Sheffield, P.J., C.J. Oliver, B.E. Kremer, S. Sheng, Z. Shao, and I.G. Macara. 2003. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J. Biol. Chem.* 278:3483–3488. doi:10.1074/jbc.M209701200.
- Shinoda, T., H. Ito, K. Sudo, I. Iwamoto, R. Morishita, and K. Nagata. 2010. Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with Septin 4. *Mol Biol Cell.* 21:1324–1334. doi:10.1091/mbc.e09-10-0869.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA A Cancer J Clin.* 70:7–30. doi:10.3322/caac.21590.
- Sinha, I., Y.-M. Wang, R. Philp, C.-R. Li, W.H. Yap, and Y. Wang. 2007. Cyclin-dependent kinases control septin phosphorylation in *Candida albicans* hyphal development. *Dev. Cell.* 13:421–432. doi:10.1016/j.devcel.2007.06.011.
- Sinha, S., and W. Yang. 2008. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cellular Signalling.* 20:1927–1934. doi:10.1016/j.cellsig.2008.05.002.
- Sirajuddin, M., M. Farkasovsky, F. Hauer, D. Kühmann, I.G. Macara, M. Weyand, H. Stark, and A. Wittinghofer. 2007. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature.* 449:311–315. doi:10.1038/nature06052.
- Sirajuddin, M., M. Farkasovsky, E. Zent, and A. Wittinghofer. 2009. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:16592–16597. doi:10.1073/pnas.0902858106.
- Sirajuddin, M., L.M. Rice, and R.D. Vale. 2014. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol.* 16:335–344. doi:10.1038/ncb2920.
- Sjöblom, B., J. Yläne, and K. Djinović-Carugo. 2008. Novel structural insights into F-actin-binding and novel functions of calponin homology domains. *Curr Opin Struct Biol.* 18:702–708. doi:10.1016/j.sbi.2008.10.003.
- Slater, D.J., E. Hilgenfeld, E.F. Rappaport, N. Shah, R.G. Meek, W.R. Williams, B.D. Lovett, N. Osheroff, R.S. Autar, T. Ried, and C.A. Felix. 2002. MLL-SEPTIN6 fusion recurs in novel translocation of chromosomes 3, X, and 11 in infant acute myelomonocytic leukaemia and in t(X;11) in infant acute myeloid leukaemia, and MLL genomic breakpoint in complex MLL-SEPTIN6 rearrangement is a DNA topoisomerase II cleavage site. *Oncogene.* 21:4706–4714. doi:10.1038/sj.onc.1205572.
- Slep, K.C., S.L. Rogers, S.L. Elliott, H. Ohkura, P.A. Kolodziej, and R.D. Vale. 2005. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *Journal of Cell Biology.* 168:587–598. doi:10.1083/jcb.200410114.
- Smith, C., L. Dolat, D. Angelis, E. Forgacs, E.T. Spiliotis, and V.E. Galkin. 2015. Septin 9 Exhibits Polymorphic Binding to F-Actin and Inhibits Myosin and Cofilin Activity. *J. Mol. Biol.* 427:3273–3284. doi:10.1016/j.jmb.2015.07.026.
- Song, Y., L.L. Kirkpatrick, A.B. Schilling, D.L. Helseth, N. Chabot, J.W. Keillor, G.V.W. Johnson, and S.T. Brady. 2013. Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules. *Neuron.* 78:109–123. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.036.

- Song, Y., Y. Zhang, Y. Pan, J. He, Y. Wang, W. Chen, J. Guo, H. Deng, Y. Xue, X. Fang, and X. Liang. 2020. The microtubule end-binding affinity of EB1 is enhanced by a dimeric organization that is susceptible to phosphorylation. *J Cell Sci.* 133:jcs241216. doi:10.1242/jcs.241216.
- Soppina, V., J.F. Herbstman, G. Skiniotis, and K.J. Verhey. 2012. Luminal Localization of  $\alpha$ -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE.* 7:e48204. doi:10.1371/journal.pone.0048204.
- Soroor, F., M.S. Kim, O. Palander, Y. Balachandran, R.F. Collins, S. Benlekbir, J. Rubinstein, and W.S. Trimble. 2020. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in-vitro polymerization properties. *Mol Biol Cell.* mbcE20060398. doi:10.1091/mbc.E20-06-0398.
- Spik, A., S. Oczkowski, A. Olszak, P. Formanowicz, J. Błazewicz, and J. Jaruzelska. 2006. Human fertility protein PUMILIO2 interacts in vitro with testis mRNA encoding Cdc42 effector 3 (CEP3). *Reprod Biol.* 6:103–113.
- Spiliotis, E.T. 2010. Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. *Cytoskeleton (Hoboken).* 67:339–345. doi:10.1002/cm.20448.
- Spiliotis, E.T., S.J. Hunt, Q. Hu, M. Kinoshita, and W.J. Nelson. 2008. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J. Cell Biol.* 180:295–303. doi:10.1083/jcb.200710039.
- Spiliotis, E.T., M. Kinoshita, and W.J. Nelson. 2005. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science.* 307:1781–1785. doi:10.1126/science.1106823.
- Sproul, L.R., D.J. Anderson, A.T. Mackey, W.S. Saunders, and S.P. Gilbert. 2005. Cik1 targets the minus-end kinesin depolymerase kar3 to microtubule plus ends. *Curr Biol.* 15:1420–1427. doi:10.1016/j.cub.2005.06.066.
- Stanbery, L., N.J. D’Silva, J.S. Lee, C.R. Bradford, T.E. Carey, M.E. Prince, G.T. Wolf, F.P. Worden, K.G. Cordell, and E.M. Petty. 2010. High SEPT9\_v1 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcomes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Transl Oncol.* 3:239–245. doi:10.1593/tlo.10109.
- Steels, J.D., M.P. Estey, C.D. Froese, D. Reynaud, C. Pace-Asciak, and W.S. Trimble. 2007. Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64:794–807. doi:10.1002/cm.20224.
- Steinmetz, M.O., and A.E. Prota. 2018. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology.* 28:776–792. doi:10.1016/j.tcb.2018.05.001.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:513–525. doi:10.1038/nrm2728.
- Su, L.K., and Y. Qi. 2001. Characterization of human MAPRE genes and their proteins. *Genomics.* 71:142–149. doi:10.1006/geno.2000.6428.
- Sudo, H., and P.W. Baas. 2010. Acetylation of Microtubules Influences Their Sensitivity to Severing by Katanin in Neurons and Fibroblasts. *Journal of Neuroscience.* 30:7215–7226. doi:10.1523/JNEUROSCI.0048-10.2010.

- Surka, M.C., C.W. Tsang, and W.S. Trimble. 2002. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 13:3532–3545. doi:10.1091/mbc.e02-01-0042.
- Surviladze, Z., A. Waller, J.J. Strouse, C. Bologa, O. Ursu, V. Salas, J.F. Parkinson, G.K. Phillips, E. Romero, A. Wandinger-Ness, L.A. Sklar, C. Schroeder, D. Simpson, J. Nöth, J. Wang, J. Golden, and J. Aubé. 2010. A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase. *In* Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145:1009–1026. doi:10.1083/jcb.145.5.1009.
- Szuba, A., F. Bano, F. Iv, M. Mavrakis, R.P. Richter, A. Bertin, and G.H. Koenderink. 2020. Membrane binding controls ordered self-assembly of animal septins. *Cell Biology*.
- Szyk, A., A.M. Deaconescu, G. Piszczek, and A. Roll-Mecak. 2011. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol.* 18:1250–1258. doi:10.1038/nsmb.2148.
- Szyk, A., A.M. Deaconescu, J. Spector, B. Goodman, M.L. Valenstein, N.E. Ziolkowska, V. Kormendi, N. Grigorieff, and A. Roll-Mecak. 2014. Molecular Basis for Age-Dependent Microtubule Acetylation by Tubulin Acetyltransferase. *Cell.* 157:1405–1415. doi:10.1016/j.cell.2014.03.061.
- Tada, T., A. Simonetta, M. Batteredon, M. Kinoshita, D. Edbauer, and M. Sheng. 2007. Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr Biol.* 17:1752–1758. doi:10.1016/j.cub.2007.09.039.
- Takehashi, M., T. Alioto, T. Stedeford, A.S. Persad, M. Banasik, E. Masliah, S. Tanaka, and K. Ueda. 2004. Septin 3 gene polymorphism in Alzheimer’s disease. *Gene Expr.* 11:263–270. doi:10.3727/000000003783992243.
- Tamborrini, D., M.A. Juanes, S. Ibanes, G. Rancati, and S. Piatti. 2018. Recruitment of the mitotic exit network to yeast centrosomes couples septin displacement to actomyosin constriction. *Nat Commun.* 9:4308. doi:10.1038/s41467-018-06767-0.
- Tang, C.S.L., and S.I. Reed. 2002. Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly. *Cell Cycle.* 1:42–49.
- Targa, B., L. Klipfel, I. Cantaloube, J. Salameh, B. Benoit, C. Poüs, and A. Baillet. 2019. Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9\_i1 and tubulin polyglutamylation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel. *Cell Death Dis.* 10:54. doi:10.1038/s41419-019-1318-6.
- Terasaki, M., L.B. Chen, and K. Fujiwara. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *The Journal of Cell Biology.* 103:1557–1568. doi:10.1083/jcb.103.4.1557.
- TerBush, D.R., T. Maurice, D. Roth, and P. Novick. 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15:6483–6494.

- Thawani, A., R.S. Kadzik, and S. Petry. 2018. XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the  $\gamma$ -tubulin ring complex. *Nat Cell Biol.* 20:575–585. doi:10.1038/s41556-018-0091-6.
- Tian, Y., X. Tian, G. Gawlak, J.J. O'Donnell, D.B. Sacks, and A.A. Birukova. 2014. IQGAP1 regulates endothelial barrier function via EB1-cortactin cross talk. *Mol Cell Biol.* 34:3546–3558. doi:10.1128/MCB.00248-14.
- Tilney, L.G., J. Bryan, D.J. Bush, K. Fujiwara, M.S. Mooseker, D.B. Murphy, and D.H. Snyder. 1973. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol.* 59:267–275. doi:10.1083/jcb.59.2.267.
- Tirnauer, J.S. 2004. A new cytoskeletal connection for APC: linked to actin through IQGAP. *Dev Cell.* 7:778–780. doi:10.1016/j.devcel.2004.11.012.
- Tkaczuk, K., and J. Yared. 2012. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *DDDT.* 371. doi:10.2147/DDDT.S28997.
- Tooley, A.J., J. Gilden, J. Jacobelli, P. Beemiller, W.S. Trimble, M. Kinoshita, and M.F. Krummel. 2009. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat. Cell Biol.* 11:17–26. doi:10.1038/ncb1808.
- Tóth, K., O. Galamb, S. Spisák, B. Wichmann, F. Sipos, G. Valcz, K. Leiszter, B. Molnár, and Z. Tulassay. 2011. The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 17:503–509. doi:10.1007/s12253-010-9338-7.
- Toyoshima, I., H. Yu, E.R. Steuer, and M.P. Sheetz. 1992. Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J Cell Biol.* 118:1121–1131. doi:10.1083/jcb.118.5.1121.
- Traikov, S., C. Stange, T. Wassmer, P. Paul-Gilloteaux, J. Salamero, G. Raposo, and B. Hoflack. 2014. Septin6 and Septin7 GTP Binding Proteins Regulate AP-3- and ESCRT-Dependent Multivesicular Body Biogenesis. *PLoS ONE.* 9:e109372. doi:10.1371/journal.pone.0109372.
- Tran, P.T., R.A. Walker, and E.D. Salmon. 1997. A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *J. Cell Biol.* 138:105–117. doi:10.1083/jcb.138.1.105.
- Tripathi, A., and K. Misra. 2016. Inhibition of P-Glycoprotein Mediated Efflux of Paclitaxel by Coumarin Derivatives in Cancer Stem Cells: An In Silico Approach. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 19:497–506. doi:10.2174/1386207319666160517115158.
- Tripodi, F., R. Pagliarin, G. Fumagalli, A. Bigi, P. Fusi, F. Orsini, M. Frattini, and P. Coccetti. 2012. Synthesis and biological evaluation of 1,4-diaryl-2-azetidinones as specific anticancer agents: activation of adenosine monophosphate activated protein kinase and induction of apoptosis. *J. Med. Chem.* 55:2112–2124. doi:10.1021/jm201344a.
- Tsang, C.W., M.P. Estey, J.E. DiCiccio, H. Xie, D. Patterson, and W.S. Trimble. 2011. Characterization of presynaptic septin complexes in mammalian hippocampal neurons. *Biological Chemistry.* 392:739–749. doi:10.1515/BC.2011.077.
- Tyska, M.J., and M.S. Mooseker. 2002. MYO1A (brush border myosin I) dynamics in the brush border of LLC-PK1-CL4 cells. *Biophys J.* 82:1869–1883. doi:10.1016/S0006-3495(02)75537-9.

- van der Vaart, B., W.E. van Riel, H. Doodhi, J.T. Kevenaer, E.A. Katrukha, L. Gummy, B.P. Bouchet, I. Grigoriev, S.A. Spangler, K.L. Yu, P.S. Wulf, J. Wu, G. Lansbergen, E.Y. van Battum, R.J. Pasterkamp, Y. Mimori-Kiyosue, J. Demmers, N. Olieric, I.V. Maly, C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2013. CFEOM1-associated kinesin KIF21A is a cortical microtubule growth inhibitor. *Dev. Cell.* 27:145–160. doi:10.1016/j.devcel.2013.09.010.
- Valenzuela, P., M. Quiroga, J. Zaldivar, W.J. Rutter, M.W. Kirschner, and D.W. Cleveland. 1981. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin mRNAs. *Nature.* 289:650–655. doi:10.1038/289650a0.
- Van Ngo, H., and S. Mostowy. 2019. Role of septins in microbial infection. *J Cell Sci.* 132:jcs226266. doi:10.1242/jcs.226266.
- Vasquez, R.J., B. Howell, A.M. Yvon, P. Wadsworth, and L. Cassimeris. 1997. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 8:973–985. doi:10.1091/mbc.8.6.973.
- Vedrenne, C., D.R. Klopfenstein, and H.-P. Hauri. 2005. Phosphorylation controls CLIMP-63-mediated anchoring of the endoplasmic reticulum to microtubules. *Mol Biol Cell.* 16:1928–1937. doi:10.1091/mbc.e04-07-0554.
- Velot, L., A. Molina, S. Rodrigues-Ferreira, A. Nehlig, B.P. Bouchet, M. Morel, L. Leconte, L. Serre, I. Arnal, D. Braguer, A. Savina, S. Honore, and C. Nahmias. 2015. Negative regulation of EB1 turnover at microtubule plus ends by interaction with microtubule-associated protein ATIP3. *Oncotarget.* 6:43557–43570. doi:10.18632/oncotarget.6196.
- Verdier-Pinard, P., E. Pasquier, H. Xiao, B. Burd, C. Villard, D. Lafitte, L.M. Miller, R.H. Angeletti, S.B. Horwitz, and D. Braguer. 2009. Tubulin proteomics: towards breaking the code. *Anal. Biochem.* 384:197–206. doi:10.1016/j.ab.2008.09.020.
- Verhey, K.J., D. Meyer, R. Deehan, J. Blenis, B.J. Schnapp, T.A. Rapoport, and B. Margolis. 2001. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol.* 152:959–970. doi:10.1083/jcb.152.5.959.
- Versele, M., and J. Thorner. 2004. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J. Cell Biol.* 164:701–715. doi:10.1083/jcb.200312070.
- Versele, M., and J. Thorner. 2005. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol.* 15:414–424. doi:10.1016/j.tcb.2005.06.007.
- Vignjevic, D., S. Kojima, Y. Aratyn, O. Danciu, T. Svitkina, and G.G. Borisy. 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *Journal of Cell Biology.* 174:863–875. doi:10.1083/jcb.200603013.
- Vinogradova, T., P.M. Miller, and I. Kaverina. 2009. Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array. *Cell Cycle.* 8:2168–2174. doi:10.4161/cc.8.14.9074.
- Vitre, B., F.M. Coquelle, C. Heichette, C. Garnier, D. Chrétien, and I. Arnal. 2008. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat Cell Biol.* 10:415–421. doi:10.1038/ncb1703.

- Vong, Q.P., Z. Liu, J.G. Yoo, R. Chen, W. Xie, A.A. Sharov, C.-M. Fan, C. Liu, M.S.H. Ko, and Y. Zheng. 2010. A role for borg5 during trophoderm differentiation. *Stem Cells*. 28:1030–1038. doi:10.1002/stem.428.
- Voter, W.A., and H.P. Erickson. 1984. The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechanism. *J. Biol. Chem.* 259:10430–10438.
- Vrignaud, P., D. Semiond, P. Lejeune, H. Bouchard, L. Calvet, C. Combeau, J.-F. Riou, A. Commercon, F. Lavelle, and M.-C. Bissery. 2013. Preclinical Antitumor Activity of Cabazitaxel, a Semisynthetic Taxane Active in Taxane-Resistant Tumors. *Clinical Cancer Research*. 19:2973–2983. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3146.
- Wadsworth, P., and E.D. Salmon. 1986. Analysis of the treadmilling model during metaphase of mitosis using fluorescence redistribution after photobleaching. *J Cell Biol*. 102:1032–1038. doi:10.1083/jcb.102.3.1032.
- Walker, R.A., S. Inoué, and E.D. Salmon. 1989. Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *J. Cell Biol*. 108:931–937. doi:10.1083/jcb.108.3.931.
- Walsh, S.R., and R. Dolin. 2011. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Review of Vaccines*. 10:1221–1240. doi:10.1586/erv.11.79.
- Walsh, V., and J. Goodman. 2002. From taxol to Taxol: the changing identities and ownership of an anti-cancer drug. *Med Anthropol*. 21:307–336. doi:10.1080/01459740214074.
- Wang, X., C.C. Decker, L. Zechner, S. Krstin, and M. Wink. 2019. In vitro wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacol Toxicol*. 20:4. doi:10.1186/s40360-018-0284-4.
- Wang, Z., T. Wu, L. Shi, L. Zhang, W. Zheng, J.Y. Qu, R. Niu, and R.Z. Qi. 2010. Conserved motif of CDK5RAP2 mediates its localization to centrosomes and the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 285:22658–22665. doi:10.1074/jbc.M110.105965.
- Wasik, A.A., Z. Polianskyte-Prause, M.-Q. Dong, A.S. Shaw, J.R. Yates, M.G. Farquhar, and S. Lehtonen. 2012. Septin 7 forms a complex with CD2AP and nephrin and regulates glucose transporter trafficking. *Mol Biol Cell*. 23:3370–3379. doi:10.1091/mbc.E11-12-1010.
- Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell*. 7:871–883. doi:10.1016/j.devcel.2004.10.017.
- Watanabe, T.M., and H. Higuchi. 2007. Stepwise movements in vesicle transport of HER2 by motor proteins in living cells. *Biophys. J*. 92:4109–4120. doi:10.1529/biophysj.106.094649.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J. Cell Biol*. 139:417–434. doi:10.1083/jcb.139.2.417.



- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1998. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol.* 8:798–806. doi:10.1016/s0960-9822(98)70321-5.
- Watson, P. 2006. Microtubule plus-end loading of p150Glued is mediated by EB1 and CLIP-170 but is not required for intracellular membrane traffic in mammalian cells. *Journal of Cell Science.* 119:2758–2767. doi:10.1242/jcs.02999.
- Watson, P., R. Forster, K.J. Palmer, R. Pepperkok, and D.J. Stephens. 2005. Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat Cell Biol.* 7:48–55. doi:10.1038/ncb1206.
- Wegner, A., and J. Engel. 1975. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys. Chem.* 3:215–225. doi:10.1016/0301-4622(75)80013-5.
- Weisbrich, A., S. Honnappa, R. Jaussi, O. Okhrimenko, D. Frey, I. Jelesarov, A. Akhmanova, and M.O. Steinmetz. 2007. Structure-function relationship of CAP-Gly domains. *Nat Struct Mol Biol.* 14:959–967. doi:10.1038/nsmb1291.
- Wilmes, A., K. Bargh, C. Kelly, P.T. Northcote, and J.H. Miller. 2007. Peloruside A Synergizes with Other Microtubule Stabilizing Agents in Cultured Cancer Cell Lines. *Mol. Pharmaceutics.* 4:269–280. doi:10.1021/mp060101p.
- Wloga, D., D.M. Webster, K. Rogowski, M.-H. Bré, N. Levilliers, M. Jerka-Dziadosz, C. Janke, S.T. Dougan, and J. Gaertig. 2009. TLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia. *Developmental Cell.* 16:867–876. doi:10.1016/j.devcel.2009.04.008.
- Wloka, C., R. Nishihama, M. Onishi, Y. Oh, J. Hanna, J.R. Pringle, M. Krauß, and E. Bi. 2011. Evidence that a septin diffusion barrier is dispensable for cytokinesis in budding yeast. *Biological Chemistry.* 392:813–829. doi:10.1515/BC.2011.083.
- Wolf, W., A. Kilic, B. Schrul, H. Lorenz, B. Schwappach, and M. Seedorf. 2012. Yeast Ist2 recruits the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and creates a ribosome-free membrane microcompartment. *PLoS ONE.* 7:e39703. doi:10.1371/journal.pone.0039703.
- Wong, C.C.L., T. Xu, R. Rai, A.O. Bailey, J.R. Yates, Y.I. Wolf, H. Zebroski, and A. Kashina. 2007. Global Analysis of Posttranslational Protein Arginylation. *PLoS Biol.* 5:e258. doi:10.1371/journal.pbio.0050258.
- Wu, J., and A. Akhmanova. 2017. Microtubule-Organizing Centers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33:51–75. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060615.
- Wu, M., G. Yang, Y. Chen, X. Zhou, H. Chen, M. Li, K. Yu, X. Zhang, S. Xie, Y. Zhang, G. Chu, and D. Mo. 2015. CEP2 attenuates myoblast differentiation but does not affect proliferation. *Int. J. Biol. Sci.* 11:99–108. doi:10.7150/ijbs.8621.
- Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs. 2008. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell.* 135:137–148. doi:10.1016/j.cell.2008.07.045.
- Wu, X., Q.-T. Shen, D.S. Oristian, C.P. Lu, Q. Zheng, H.-W. Wang, and E. Fuchs. 2011. Skin Stem Cells Orchestrate Directional Migration by Regulating Microtubule-ACF7 Connections through GSK3 $\beta$ . *Cell.* 144:341–352. doi:10.1016/j.cell.2010.12.033.

- Xiao, H., K. El Bissati, P. Verdier-Pinard, B. Burd, H. Zhang, K. Kim, A. Fiser, R.H. Angeletti, and L.M. Weiss. 2010. Post-Translational Modifications to *Toxoplasma gondii*  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulins Include Novel C-Terminal Methylation. *J. Proteome Res.* 9:359–372. doi:10.1021/pr900699a.
- Xie, H., M. Surka, J. Howard, and W.S. Trimble. 1999. Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 43:52–62. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1999)43:1<52::AID-CM6>3.0.CO;2-5.
- Xie, Y., J.P. Vessey, A. Konecna, R. Dahm, P. Macchi, and M.A. Kiebler. 2007. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr Biol.* 17:1746–1751. doi:10.1016/j.cub.2007.08.042.
- Xu, M., M. Takanashi, K. Oikawa, H. Nishi, K. Isaka, T. Yoshimoto, J. Ohyashiki, and M. Kuroda. 2012. Identification of a novel role of Septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. *Cancer Sci.* 103:821–827. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02221.x.
- Xu, R., N. Sato, K. Yanai, T. Akiyoshi, S. Nagai, J. Wada, K. Koga, R. Mibu, M. Nakamura, and M. Katano. 2009. Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer Res.* 29:261–270.
- Yang, C., J. Wu, C. de Heus, I. Grigoriev, N. Liv, Y. Yao, I. Smal, E. Meijering, J. Klumperman, R.Z. Qi, and A. Akhmanova. 2017. EB1 and EB3 regulate microtubule minus end organization and Golgi morphology. *J Cell Biol.* 216:3179–3198. doi:10.1083/jcb.201701024.
- Yang, H., W. Mao, C. Rodriguez-Aguayo, L.S. Mangala, G. Bartholomeusz, L.R. Iles, N.B. Jennings, A.A. Ahmed, A.K. Sood, G. Lopez-Berestein, Z. Lu, and R.C. Bast. 2018. Paclitaxel Sensitivity of Ovarian Cancer Can be Enhanced by Knocking Down Pairs of Kinases that Regulate MAP4 Phosphorylation and Microtubule Stability. *Clin Cancer Res.* 24:5072–5084. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0504.
- Yang, J., Y. Wang, T. Wang, J. Jiang, C.H. Botting, H. Liu, Q. Chen, J. Yang, J.H. Naismith, X. Zhu, and L. Chen. 2016. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of  $\alpha$ -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun.* 7:12103. doi:10.1038/ncomms12103.
- Yang, Y.-M., M.J. Fedchyshyn, G. Grande, J. Aitoubah, C.W. Tsang, H. Xie, C.A. Ackerley, W.S. Trimble, and L.-Y. Wang. 2010. Septins Regulate Developmental Switching from Microdomain to Nanodomain Coupling of Ca<sup>2+</sup> Influx to Neurotransmitter Release at a Central Synapse. *Neuron.* 67:100–115. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.003.
- Yang, Z., V.J. Gurvich, M.L. Gupta, N.F. Mivechi, and L. Ko. 2019. Oncoprotein GT198 is a direct target of taxol. *Pharmacology and Toxicology.*
- Yogev, S., C.I. Maeder, R. Cooper, M. Horowitz, A.G. Hendricks, and K. Shen. 2017. Local inhibition of microtubule dynamics by dynein is required for neuronal cargo distribution. *Nat Commun.* 8:15063. doi:10.1038/ncomms15063.
- Yüce, O., A. Piekny, and M. Glotzer. 2005. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J. Cell Biol.* 170:571–582. doi:10.1083/jcb.200501097.

- Yue, J., Y. Zhang, W.G. Liang, X. Gou, P. Lee, H. Liu, W. Lyu, W.-J. Tang, S.-Y. Chen, F. Yang, H. Liang, and X. Wu. 2016. In vivo epidermal migration requires focal adhesion targeting of ACF7. *Nat Commun.* 7:11692. doi:10.1038/ncomms11692.
- Zander, S., S. Baumann, S. Weidtkamp-Peters, and M. Feldbrügge. 2016. Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J Cell Sci.* 129:2778–2792. doi:10.1242/jcs.182824.
- Zanic, M., P.O. Widlund, A.A. Hyman, and J. Howard. 2013. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nat. Cell Biol.* 15:688–693. doi:10.1038/ncb2744.
- Zeng, Y., Y. Cao, L. Liu, J. Zhao, T. Zhang, L. Xiao, M. Jia, Q. Tian, H. Yu, S. Chen, and Y. Cai. 2019. SEPT9\_i1 regulates human breast cancer cell motility through cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation. *Cell Death Dis.* 10:720. doi:10.1038/s41419-019-1947-9.
- Zent, E., and A. Wittinghofer. 2014. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biol. Chem.* 395:169–180. doi:10.1515/hsz-2013-0268.
- Zhang, D., G.C. Rogers, D.W. Buster, and D.J. Sharp. 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the “Pacman-flux” machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol.* 177:231–242. doi:10.1083/jcb.200612011.
- Zhang, H. 2016. Polarity Determinants in Dendritic Spine Development and Plasticity. *Neural Plast.* 2016:3145019. doi:10.1155/2016/3145019.
- Zhang, J., M. Fonovic, K. Suyama, M. Bogoyo, and M.P. Scott. 2009. Rab35 Controls Actin Bundling by Recruiting Fascin as an Effector Protein. *Science.* 325:1250–1254. doi:10.1126/science.1174921.
- Zhang, J., C. Kong, H. Xie, P.S. McPherson, S. Grinstein, and W.S. Trimble. 1999. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* 9:1458–1467. doi:10.1016/s0960-9822(00)80115-3.
- Zhang, N., L. Liu, N. Fan, Q. Zhang, W. Wang, M. Zheng, L. Ma, Y. Li, and L. Shi. 2016. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. *Oncotarget.* 7:61587–61600. doi:10.18632/oncotarget.11402.
- Zhang, X., J. Cai, Z. Zheng, L. Polin, Z. Lin, A. Dandekar, L. Li, F. Sun, R.L. Finley, D. Fang, Z.-Q. Yang, and K. Zhang. 2015. A novel ER-microtubule-binding protein, ERLIN2, stabilizes Cyclin B1 and regulates cell cycle progression. *Cell Discov.* 1:15024. doi:10.1038/celldisc.2015.24.
- Zhao, X., and S.A. Rotenberg. 2014. Phosphorylation of Cdc42 effector protein-4 (CEP4) by protein kinase C promotes motility of human breast cells. *J. Biol. Chem.* 289:25844–25854. doi:10.1074/jbc.M114.577783.
- Zheng, Y., R.A. Buchwalter, C. Zheng, E.M. Wight, J.V. Chen, and T.L. Megraw. 2020. A perinuclear microtubule-organizing centre controls nuclear positioning and basement membrane secretion. *Nat Cell Biol.* 22:297–309. doi:10.1038/s41556-020-0470-7.
- Zheng, Y., M.L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378:578–583. doi:10.1038/378578a0.

- Zhu, A.X., Y. Zhao, and J.S. Flier. 1994. Molecular cloning of two small GTP-binding proteins from human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1875–1882. doi:10.1006/bbrc.1994.2889.
- Zhu, L., and L. Chen. 2019. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell Mol Biol Lett.* 24:40. doi:10.1186/s11658-019-0164-y.
- Zhu, M., F. Wang, F. Yan, P.Y. Yao, J. Du, X. Gao, X. Wang, Q. Wu, T. Ward, J. Li, S. Kioko, R. Hu, W. Xie, X. Ding, and X. Yao. 2008. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J. Biol. Chem.* 283:18916–18925. doi:10.1074/jbc.M710591200.

**Titre :** Interrelations entre les filaments de septines, les microfilaments d'actine et les microtubules : adaptations fonctionnelles en réponse aux taxanes

**Mots clés :** Septines, BORG2, Cdc42, Actine, Microtubules, Chimiorésistance

**Résumé :** Les septines, une famille de GTPases qui s'oligomérisent en filaments, forment un nouvel élément du cytosquelette. Principalement alignés avec l'actine corticale et les fibres de stress en condition basale, les filaments de septines peuvent aussi s'associer intégralement aux microtubules (MT), notamment en réponse à un traitement par les taxanes, des molécules stabilisatrices de MT utilisées en chimiothérapie. Les travaux de cette thèse visent à mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'association des filaments de septines avec les autres éléments du cytosquelette, comme en réponse aux taxanes. La résistance des cellules tumorales aux taxanes limite leur emploi en clinique. Mon équipe a mis en évidence un nouveau mécanisme de résistance développé par des cellules adaptées au long cours au paclitaxel, dans lequel la relocalisation des filaments de septines, des fibres de stress vers les MT augmente leur dynamique, contrecarrant ainsi l'effet stabilisateur du paclitaxel. Pendant ma thèse, j'ai montré que, comme dans le cas de l'adaptation à long terme, un traitement aigu par le paclitaxel induit rapidement, une relocalisation complète des filaments de septines, de l'actine vers les MT. Ceci conduit les cellules initialement sensibles à développer une résistance au paclitaxel. Le co-alignement des filaments de septines et des MT ne résulte pas de la stabilisation des MT par le paclitaxel mais ne s'observe que chez les lignées qui expriment un niveau basal élevé de SEPT9\_i1. Cette isoforme, connue pour être de mauvais pronostic, est nécessaire mais insuffisante pour le changement de localisation des septines. En cherchant des déterminants moléculaires impliqués dans cette relocalisation, j'ai établi que la protéine BORG2, effectrice de Cdc42 qui lie les septines à l'actine dans les cellules en interphase, est rapidement dégradée par le protéasome suite à un traitement par le paclitaxel. En l'absence de tout traitement, l'inhibition

d'expression de BORG2 mime les effets du paclitaxel en induisant le détachement des filaments de septines des fibres de stress et leur relocalisation le long des MT, ainsi qu'une résistance à la drogue. À l'inverse, la surexpression de BORG2 maintient les septines sur les fibres d'actine même après un traitement par le paclitaxel, sans affecter la sensibilité à ce taxane. De façon intéressante, le paclitaxel inhibe partiellement Cdc42, entraînant une baisse de BORG2 et la relocalisation des filaments de septines. Ce phénotype est aussi observé après surexpression d'un mutant inactif de Cdc42, tandis que l'expression d'un mutant constitutivement actif se liant partiellement aux fibres de stress, maintient un niveau d'expression suffisant de BORG2 pour retenir les septines sur l'actine, même après un traitement par le paclitaxel. Ces résultats révèlent les rôles de Cdc42 et de BORG2 dans le contrôle de l'interaction entre les filaments de septines, les fibres d'actine et les MT en condition basale et en réponse aux taxanes. Par ailleurs, après avoir observé, en dehors de tout traitement, que la dépolymérisation des MT provoque une disparition complète des filaments de septines même lorsqu'ils sont associés à l'actine, j'ai exploré le rôle des MT dans l'adressage des septines sur les filaments d'actine. Des résultats préliminaires montrent qu'après inhibition du complexe moteur dynéine/dynactine, les septines colocalisent avec les MT. À l'état basal, le trafic intracellulaire dépendant des MT semble donc jouer un rôle dans l'adressage des filaments de septines aux fibres d'actine. En conclusion, mon travail a permis de mettre en évidence des acteurs clés de la régulation de la compartimentation subcellulaire des filaments de septines, à l'état basal et en réponse aux taxanes : SEPT9\_i1, BORG2, Cdc42 ainsi que certains moteurs moléculaires associés aux MT.

**Title :** Interplay between septin filaments, actin microfilaments and microtubules: Functional adaptations in response to taxanes

**Keywords :** Septins, BORG2, Cdc42, Actin, Microtubules, Chemoresistance

**Abstract :** Septins, a family of GTP-binding proteins that oligomerize into filaments form a new component of the cytoskeleton. Mainly aligned with cortical actin and stress fibers in basal condition, septin filaments can also fully associate with microtubules (MT), especially in response to treatments with taxanes which are MT-stabilizing molecules used in chemotherapy. The work of my thesis aims to better understand the molecular mechanisms that control the association of septin filaments with other elements of the cytoskeleton, such as in response to taxanes. The resistance of tumor cells to taxanes limits their clinical use. My team has demonstrated a new resistance mechanism developed by cells long term-adapted to paclitaxel, in which the relocalization of septin filaments, from stress fibers to MT, increases their dynamics, thus counteracts the stabilizing effect of paclitaxel. During my thesis, I showed that, just as with long-term adaptation, acute treatment with paclitaxel quickly induces complete relocalization of septin filaments from actin to MT. This leads initially sensitive cells to develop resistance to paclitaxel. Co-alignment of septin filaments and MT does not result from the stabilization of MT by paclitaxel but is only seen in cell lines that express a high basal level of SEPT9\_i1. This isoform, known to be of poor prognosis, is necessary for the change in the localization of septins to take place, but is not sufficient. By searching for molecular determinants involved in this relocalization, I established that BORG2, an effector of Cdc42 that binds septins to actin in cells during interphase, is rapidly degraded by the proteasome after paclitaxel treatment. In the absence of any treatment, inhibiting the expression of BORG2 mimics the effects of paclitaxel by causing the detachment of septin filaments from stress fibers

and their relocalization along MT coupled with drug resistance.

Conversely, the overexpression of BORG2 maintains septins on actin fibers even after paclitaxel treatment, without affecting the sensitivity to this taxane. Interestingly, paclitaxel partially inhibits Cdc42 leading to a decrease in BORG2 and the relocalization of septin filaments. This phenotype is also observed after overexpression of an inactive mutant of Cdc42, while the expression of a constitutively active mutant partially binding to stress fibers, maintains a sufficient level of expression of BORG2 to retain septins on actin, even after treatment with paclitaxel. These results reveal the roles of Cdc42 and BORG2 in controlling the interaction between septin filaments, actin fibers and MT in basal condition and in response to taxanes. Furthermore, after observing, without any treatment, that the depolymerization of MT causes a complete disappearance of septin filaments even when they are associated to actin, I explored the role of MT in delivering septins on actin filaments. Preliminary results show that after inhibition of the dynein/dynactin motor complex, septins colocalize with MT. In the basal state, intracellular trafficking dependent on MT seems to play a role in targeting septin filaments to actin fibers. In conclusion, my work has made it possible to highlight key players in the regulation of subcellular compartmentalization of septin filaments, in the basal state and in response to taxanes: SEPT9\_i1, BORG2, Cdc42 as well as certain molecular motors associated with MT.