



Université de Montréal

Caractérisation des structures de Septines hautement  
organisées chez la *Drosophila* et leur interaction avec le  
cytosquelette d'Actine

Zlatina Dragieva

Département de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade du  
Maître en Science en Biologie Moléculaire et Maladies Complexes

08 Juin, 2016

© Zlatina Dragieva 2016

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation des structures de Septines hautement  
organisées chez la *Drosophila* et leur interaction avec le  
cytosquelette d'Actine

Présenté par :

Zlatina Dragieva

## Résumé

Les septines sont des GTPases conservées dérégulées dans le cancer et les maladies neurodégénératives. Elles servent de protéines d'échafaudage et forment une barrière de diffusion à la membrane plasmique et au corps central lors de la cytokinèse. Elles interagissent avec l'actine et s'organisent en complexes qui polymérisent et forment des structures hautement organisées (anneaux et filaments). Leur dynamique d'assemblage et leur rôle dans la cellule restent à être élucidés. La *Drosophile* est un modèle simple pour l'étude des septines puisqu'on n'y retrouve que 5 gènes (*sep1*, *sep2*, *sep4*, *sep5*, *peanut*) comparativement aux 13 gènes chez l'humain.

À l'aide d'un anticorps contre Pnut, nous avons identifié des structures tubulaires dans 30% des cellules S2 de *Drosophile*. Mon projet a comme but de caractériser ces tubes en élucidant leurs constituants, leur comportement et leurs propriétés pour mieux clarifier le mécanisme par lequel les septines forment des structures hautement organisées et interagissent avec le cytosquelette d'actine.

Par immunofluorescence, j'ai pu démontrer que ces tubes sont cytoplasmiques, en mitose ou interphase, ce qui suggère qu'ils ne sont pas régulés par le cycle cellulaire. Pour investiguer la composition et les propriétés dynamiques de ces tubes, j'ai généré une lignée cellulaire exprimant Sep2-GFP qui se localise aux tubes et des ARNi contre les cinq septines. Trois septines sont importantes pour la formation de ces tubes et anneaux notamment Sep1, Sep2 et Pnut. La déplétion de Sep1 cause la dispersion du signal GFP en flocons, tandis que la déplétion de Sep2 ou de Pnut mène à la dispersion du signal GFP uniformément dans la cellule. Des expériences de FRAP sur la lignée Sep2-GFP révèlent un signal de retour très lent, ce qui indique que ces structures sont très stables.

J'ai aussi démontré une relation entre l'actine et les septines. Le traitement avec la Latrunculin A (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) ou la Jasplakinolide (un stabilisateur des filaments d'actine) mène à la dépolymérisation rapide (< 30 min) des tubes en anneaux flottants dans le cytoplasme, même si ces tubes ne sont pas reconnus suite à un marquage de la F-actine. L'Actin05C-mCherry se localise aux tubes, tandis que le mutant déficient de la polymérisation, Actin05C-R62D-mCherry perd cette localisation. On observe aussi que la déplétion de la Cofiline et de l'AIP1 (ce qui déstabilise l'actine) mène au même

phénotype que le traitement avec la Latrunculine A ou la Jasplakinolide. Alors on peut conclure qu'un cytosquelette d'actine dynamique est nécessaire pour la formation et le maintien des tubes de septines.

Les futures études auront comme but de mieux comprendre l'organisation des septines en structures hautement organisées et leur relation avec l'actine. Ceci sera utile pour l'élaboration du réseau d'interactions des septines qui pourra servir à expliquer leur dérégulation dans le cancer et les maladies neurodégénératives.

Mots clés : septine, actine, tubes, anneaux, hautement organisés, complexes, hexamère

# Abstract

Septins are highly conserved GTP-binding proteins deregulated in diseases such as cancer and neurodegenerative diseases. Septins scaffold other proteins and act as diffusion barriers at the plasma membrane and midbody during cytokinesis. They interact with the actin cytoskeleton and have been observed to form ordered complexes that can polymerize into higher-order structures such as filaments and rings. The principles of assembly and disassembly of such filaments and rings and their cellular roles are yet to be elucidated. *Drosophila* offers a simple system, as there are only 5 septin genes: *peanut*, *sep1*, *sep2*, *sep4*, and *sep5* in contrast to 13 found in humans.

We have previously found that *Drosophila* S2 cells contain unusual tubular structures that label with Peanut antibody. The goal of my Master's project has been to characterise these structures, by defining their constituents, behaviours and properties, in the hope that this will shed light on the mechanisms by which septins can form higher-ordered structures and how they interact with other cytoskeletal elements such as actin.

Using fluorescence microscopy, I show that these tubes are cytoplasmic and present in 30% of cells, both during mitosis and interphase, suggesting they are not cell cycle regulated. To investigate their composition and dynamic properties, I generated S2 cell lines stably expressing Sep2-GFP, which localizes to septin tubes and double stranded RNAs against all septins. The products of three septin genes were found to be essential for the assembly of septin tubes: Sep1, Sep2, and Pnut. The depletion of Sep1 led to the dispersal of the GFP signal into cytoplasmic clumps, whereas the depletion of Sep2 and Pnut led to its uniform distribution through the cell. FRAP analysis of Sep2-GFP revealed only slow recovery after many hours, indicating that the structures are very stable.

I also discovered an unusual relationship between septin tubes and the actin cytoskeleton. Although the tubes did not label with conventional F-actin probes (Phalloidin, LifeAct), treatment with inhibitors of F-actin assembly (Latrunculin A) or disassembly (Jasplakinolide) led to their rapid (<30 min) dispersal into scattered rings. Furthermore, overexpressed Actin05C-mCherry localised to the septin tubes, while a polymerization-deficient mutant Actin05C-R62D-mCherry did not. Depletion of the actin severing protein Cofilin and the actin capping protein AIP1 also disrupted septin tubes dispersing them into cytoplasmic rings. A dynamic actin

cytoskeleton is thus required for the formation and/or maintenance of higher ordered structures such as rings and tubes.

**Conclusion and Relevance:** Ongoing studies aim to further elucidate how septins organize into such ordered structures and how actin regulates the process. This will clarify the septin network of interactions and facilitate the comprehension of their implication in cancer and neurodegenerative diseases.

Key words: actin, septin, tube, ring, higher-order, hexamer, cofilin, AIP1

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	1
Liste des figures.....	2
Liste des Abréviations.....	4
Remerciements.....	5
1. Introduction.....	8
1.1 Le cytosquelette cellulaire.....	9
1.1.1 Les microtubules.....	9
1.1.2 Les filaments intermédiaires.....	9
1.1.3 L'actine.....	10
1.1.4 Les septines.....	13
1.2 Les septines dans les organismes modèles.....	14
1.2.1 Les septines chez la levure bourgeonnante.....	14
1.2.2 Les septines chez l'humain.....	17
1.2.3 Les septines chez la <i>Drosophile</i> .....	17
1.3 Structure.....	19
1.3.1 Motifs et Domaines protéiques.....	19
1.3.2 Interfaces G et NC.....	20
1.3.3 Le rôle du GTP/GDP dans la polymérisation des septines.....	22
1.3.4 Modifications post traductionnelles.....	23
1.4 La relation avec l'actine.....	23
1.4.1 Les septines et le cytosquelette d'actine lors de la division.....	23
1.4.2 Les septines comme modulateurs de l'actine.....	24
1.4.3 Les drogues qui influencent le cytosquelette d'actine.....	25
1.4.4 Lien entre les septines et le cytosquelette d'actine.....	26
1.4.5 Expression différentielle des septines.....	27
1.5 Sondes de F-actine.....	28

1.6 Le Forchlorophenuron (FCF).....	29
1.7 Les septines et leur rôle dans la cellule.....	29
1.7.1 Protéines d'échafaudage .....	30
1.7.2 Barrière de diffusion .....	31
1.8 Dérégulation des septines et pathologies .....	31
1.8.1 Le cancer .....	32
1.8.2 Maladies neurodégénératives.....	34
1.8.3 Ciliopathies et Infertilité .....	34
2. Projet de recherche.....	35
2.1 Problématique et hypothèse .....	35
2.2 Procédures expérimentales et objectifs.....	35
3. Matériels et Méthodes.....	37
Clonage et Mutagénèse .....	37
Les ARN interférants (ARNis) .....	39
Culture cellulaire.....	42
Les cellules ont été passées dans des plaques de 24, 12 ou 6 puits dans du milieu de Schneider supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) et de la pénicilline/streptomycine chaque semaine pour maintenir une bonne croissance. ....	42
Transfections et lignées cellulaires .....	42
L'immunobuvardage de type Western.....	42
Microscopie.....	43
Immunofluorescence.....	44
Récupération de fluorescence après photo-blanchissement.....	45
4. Résultats.....	46
4.1 Pnut est essentiel pour les structures de septines .....	46
4.2 Les septines forment des anneaux et des tubes cytoplasmiques .....	47
4.3 Sep1, Sep2 et Pnut sont essentiels pour la formation des tubes de septines.....	51

4.4 Il peut y avoir de l'hétérogénéité dans la formation des complexes de septines .....	54
4.5 Les tubes de septines ne sont pas régulés par le cycle cellulaire, mais les anneaux disparaissent pendant la mitose.....	55
4.6 Les tubes de septines sont stables .....	56
4.7 Un cytosquelette d'actine dynamique est nécessaire pour le maintien des tubes .....	57
4.7.1 La Jasplakinolide .....	58
4.7.2 La Latrunculin A.....	58
4.8 Le traitement avec le forchlorfenuron induit la formation de structures anormales de septines.....	61
4.9 Les sondes de F-actine ne se localisent pas aux tubes et aux anneaux de septines .....	62
4.9.1 La phalloïdine .....	62
4.9.2 LifeAct.....	62
4.10 L'Actin05C-mCH se localise aux tubes, mais pas aux anneaux .....	64
4.11 La capacité de l'actine à polymériser est essentielle pour sa localisation aux tubes de septines.....	65
4.11.1 Le mutant Actin05C R62D .....	65
4.11.2 Le mutant Actin05C R62D se localise mal aux lamellipodes riches en actine.....	65
4.11.3 Le mutant Actin05C R62D se localise mal aux tubes de septines.....	66
4.11.4 Le mutant Actin05C R62D forme des punctas .....	67
4.12 La stabilisation de l'actine avec la Jasplakinolide induit une perte précoce de Sep2 des tubes .....	68
4.13 La déplétion d'AIP1 et de la cofiline mène à la déstabilisation des tubes.....	70
4.13.1 La cofiline .....	70
4.13.2 L'AIP1 .....	70
4.14 L'actine marquée avec mCH s'intègre moins bien dans les structures de septines.....	71
5. Discussion.....	73
5.1 Les septines forment des tubes et des anneaux hautement organisés dans les cellules S2 de <i>Drosophile</i> .....	73
5.2 Pnut, Sep1 et Sep2 sont essentiels pour la formation de ces tubes et de ces anneaux.....	74

5.3 Les tubes de septines ne sont pas nécessaires pour la cytokinèse.....	75
5.4 Les tubes de septines sont stables .....	75
5.5 La Latrunculine A, le Cytochalasin D et la Jasplakinolide déstabilisent le cytosquelette de septines.....	76
5.6 La déplétion de l'AIP1 et de la cofiline déstabilise le cytosquelette de septines .....	76
5.7 L'actine se localise aux tubes de septines.....	77
5.8 La capacité de polymérisation de l'actine est essentielle pour sa localisation aux tubes de septines.....	77
5.9 L'actine endogène est nécessaire pour le maintien des structures de septines .....	78
5.10 Futures expériences et perspectives .....	78
Conclusion .....	80
Bibliographie.....	81

# Liste des tableaux

**Tableau I. L'expression et l'implication des septines dans le cancer**

**Tableau II. Les amorces utilisées pour la construction des lignées cellulaires**

**Tableau III. Les amorces utilisées pour la construction des différents ARNs**

# Liste des figures

Figure 1. Le cytosquelette cellulaire

Figure 2. Les modulateurs de la polymérisation de l'actine

Figure 3. Les septines chez la levure bourgeonnante

Figure 4. Structure cristalline de l'hexamère de septines purifié chez l'humain

Figure 5. L'hexamère de base et la formation des structures hautement organisées de septines chez la *Drosophila*.

Figure 6. La structure élémentaire et les interfaces d'interaction des septines

Figure 7. L'effet des septines sur l'organisation de l'actine (*in vivo*) dans les canaux du sillon lors de la cellularisation chez la *Drosophila*

Figure 8. L'effet stabilisant de la phalloïdine sur les filaments d'actine

Figure 9. Les structures de septines sont cytoplasmiques

Figure 10. La déplétion de Pnut déstabilise les structures de septines observées

Figure 11. Les septines forment des anneaux et des tubes cytoplasmiques dans les cellules S2 de *Drosophila*

Figure 12. Les tubes et les anneaux de septines présentent des diamètres similaires

Figure 13. Effet de la déplétion des différentes septines sur les anneaux et tubes

Figure 14. Sep1, Sep2 et Pnut colocalisent aux tubes de septines

Figure 15. La déplétion de Sep1 diminue les niveaux d'expression de Pnut à moins de 25 %

Figure 16. Sep5 se localise dans des filaments de septines

Figure 17. Effet de la déplétion des différentes septines sur les filaments

Figure 18. Les tubes de septines persistent pendant la division cellulaire, tandis que les anneaux disparaissent

Figure 19. Les tubes de septines sont stables sur des longues périodes de temps

Figure 20. Les tubes de septines requièrent un cytosquelette d'actine intact

Figure 21 FCF induit la formation des structures anormales de septines

Figure 22. Les sondes de F-actine ne reconnaissent pas les tubes ni les anneaux de septines

Figure 23. L'Actin05C colocalise avec Sep2 aux tubes de septines, mais pas aux anneaux

**Figure 24. La capacité de l'actine à se polymériser est essentielle pour sa localisation aux tubes de septines**

**Figure 25. Le mutant forme des punctas qui sont différents des anneaux de septines observés**

**Figure 26. Sep2-GFP se localise aux tubes et pars en premier après le traitement avec la Jasplakinolide**

**Figure 27. La déplétion de Cofilin/AIP1 déstabilise les tubes de septines**

**Figure 28. La déplétion de l'actine endogène déstabilise les tubes de septines et augmente l'expression de l'Actine-mCH exogène qui est sous contrôle du promoteur *actin05C***

# Liste des Abréviations

ARNi : Acide Ribonucléique interférent

ARNdb : Acide Ribonucléique double brin

ATP: Adénosine Triphosphate

GTP : Guanine Triphosphate

CC : Coiled-Coil

GTPBD : Guanine Triphosphate Binding domain

SUE : Septin Unique Element

PH : Pleckstrine Homology

Pnut : Peanut

Sep1 : Septine 1

Sep2 : Septine 2

Sep4 : Septine 4

Sep5 : Septine 5

LatA : Latrunculin A

Jasp : Jasplakinolide

FH1 : formin homology 1

FH2 : formin homology 2

Arp2 : actin related protein 2

AIP 1: actin interacting protein 1

# Remerciements

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche Gilles Hickson de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche autant pour mon stage que pour ma maîtrise. Merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la *Drosophile* et de la microscopie pendant ces années, tout en me donnant tout le support nécessaire. J'ai beaucoup appris pendant mon séjour et j'apprécie énormément tous les conseils et idées partagées pendant les présentations, préparations d'affiches et rencontres.

Je remercie Nour El Amine de m'avoir supervisée pendant mon stage et de m'avoir donné tous les outils nécessaires pour poursuivre mes études à la maîtrise. Il a été pour moi un modèle à suivre, mais aussi un ami vers qui j'ai pu me tourner autant dans les moments difficiles que dans les moments de célébrations. Merci d'avoir été là pour moi et pour tout le chocolat et la crème glacée partagés tout au cours de ces années.

Je remercie Yvonne Ruella, une personne inoubliable. Merci, Yvonne, pour toute ton aide et ton amitié; je n'aurais pas pu le faire sans toi! Tu as toujours cru en moi et tu as su comment remonter mon moral. Merci aussi pour les gommages, le chocolat et les gâteaux. Merci d'être restée au laboratoire après toutes les péripéties rencontrées. Merci d'être toi-même! Woot Woot, j'ai presque fini! :)

Je remercie Amel Kechad pour tous les moments partagés. Pour les ordres du jour et les photos et vidéos de Maniloup. Merci pour ton aide avec ma lettre de motivation et mon CV qui m'ont valu mon nouveau travail. Ce fut un plaisir de travailler avec toi. Ne lâche pas, tu as bientôt fini!!!

J'aimerais remercier Silvana Jananji d'avoir été là pour répondre à toutes mes questions et pour me guider pendant ma maîtrise! Merci d'avoir bien géré le laboratoire, une tâche qui n'est pas facile!

J'aimerais remercier Mélanie Diaz pour toutes les conversations de films, repas et voyages. Merci d'avoir été aux cours de maîtrise avec moi, ce fut un plaisir de te connaître. Tu es très talentueuse, ne laisses jamais personne te dire autrement!

J'aimerais remercier tous les étudiants d'été Roberto Diaz, Louis Philippe Picard et Elisabeth. Merci, Roberto, pour ton aide et ton attitude positive!

J'aimerais aussi remercier quelques autres personnes que j'ai rencontrées à l'hôpital Sainte Justine. Merci à Lina et Maude d'avoir été là. Merci à l'équipe de volleyball et aux membres de l'association étudiante. Vous avez rendu mon passage à la maîtrise beaucoup plus agréable.

Je tiens aussi à remercier la Fondation des étoiles du CHU Sainte Justine pour la bourse attribuée.

*For my family, loved ones and all that helped me along the way!*

# 1. Introduction

La morphologie cellulaire a évolué pour mieux maintenir les fonctions des divers types cellulaires composant les tissus des différents organes d'un organisme. On retrouve une grande diversité de cellules comme les cellules neuronales, les cellules de macrophages, les cellules épithéliales, etc.<sup>3</sup>. Chaque tissu présente des cellules spécialisées, caractérisées par leur forme, rigidité, polarité, et expression génique. La forme, la rigidité et le mouvement d'une cellule sont fortement régulés par son cytosquelette composé d'actine, de microtubules, et de filaments intermédiaires, tel qu'illustré à la Figure 1<sup>4</sup>. Ces composantes structurales organisent un réseau de filaments dynamiques dans le cytoplasme de la cellule qui s'assemble, ou se désassemble, suite à des signaux externes spécifiques comme des facteurs solubles, la présence d'autres cellules ou les interactions avec la matrice extracellulaire<sup>4</sup>.

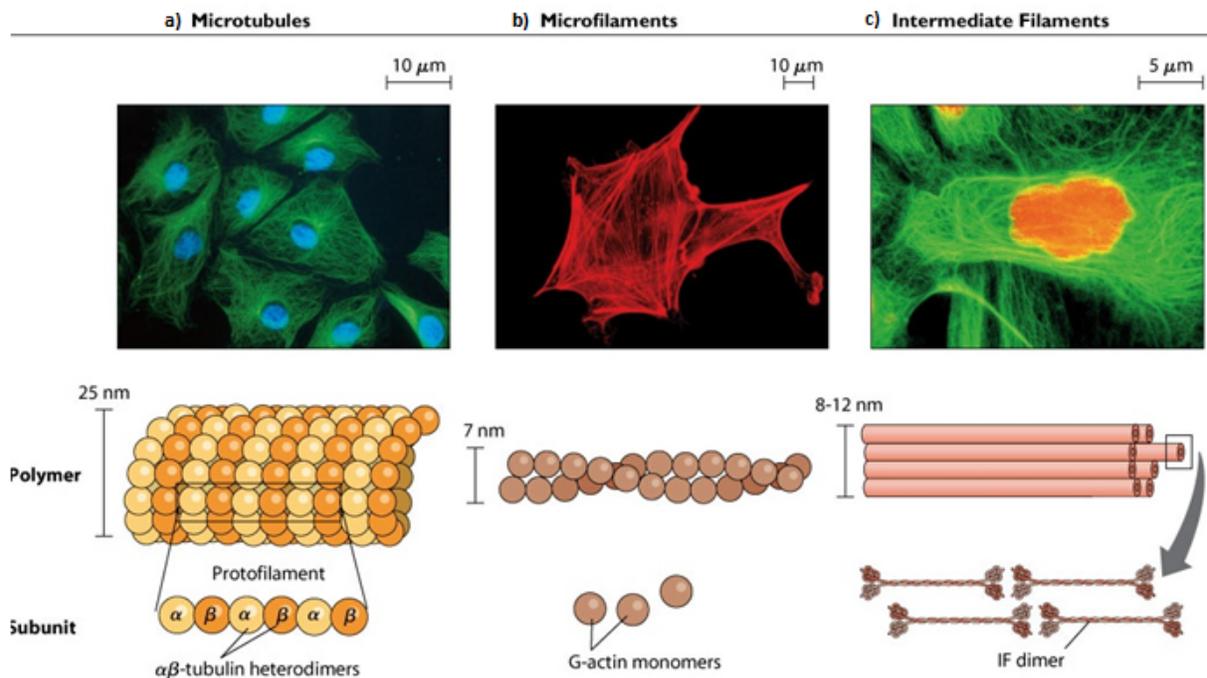


Figure 1. Le cytosquelette cellulaire

Le cytosquelette de la cellule est composé des A) Microtubules B) Microfilaments d'actine C) Filaments intermédiaires. Ensemble, ces composantes forment un réseau élaboré de filaments qui est important pour la migration cellulaire, la forme et la rigidité de la cellule <sup>4</sup>.

## 1.1 Le cytosquelette cellulaire

### 1.1.1 Les microtubules

Les microtubules sont des longs tubes qui jouent un rôle important dans l'organisation et dans la structure de la cellule, la division et le transport cellulaire <sup>3</sup>. Ils se composent d'hétérodimères de tubuline alpha et tubuline bêta (50 kDa) qui polymérisent et forment des protofilaments, tel qu'illustré à la Figure 1, A . Treize protofilaments peuvent ensuite s'assembler latéralement pour former des structures cylindriques (tubes) d'un diamètre d'environ 25 nm qu'on appelle les microtubules <sup>5</sup>. Ces tubes possèdent une extrémité positive dynamique et une extrémité négative moins dynamique. Une instabilité dynamique est observée dans la cellule lorsque les microtubules s'effondrent (catastrophe) ou s'allongent très rapidement (sauvetage). L'alpha tubuline et la bêta tubuline lient toutes deux le GTP, mais seulement la tubuline bêta est capable de l'hydrolyser en GDP <sup>5</sup>.

### 1.1.2 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des filaments non polaires d'un diamètre d'environ 11 nm, formés de tétramères de dimères antiparallèles surenroulées qui se chevauchent au milieu de la structure, tel qu'illustré à la Figure 1, C <sup>5</sup>. Huit de ces tétramères s'assemblent pour former une nouvelle unité (ULF : unit length filament) qui peut polymériser longitudinalement pour donner place à des longs filaments <sup>5</sup>. Ces filaments sont spécifiques à certains tissus et jouent un rôle dans le support et l'intégrité structurale de la cellule en participant dans l'organisation de la membrane nucléaire <sup>3</sup>. Par contre, certaines cellules d'insectes comme celles de la *Drosophila* ne présentent pas de filaments intermédiaires cytoplasmiques, malgré le fait qu'elles expriment certaines lamines nucléaires conservées retrouvées aussi dans les cellules de mammifères <sup>6</sup>.

### 1.1.3 L'actine

L'actine est une protéine (40 kDa) du cytosquelette cellulaire qui se retrouve sous deux formes distinctes soient, sous forme globulaire (G-actin) ou filamenteuse (F-actine). Le cytosquelette d'actine est une structure très dynamique où les deux formes d'actines coexistent dans la cellule sous une stricte balance. La F-actine est la forme polymérisée de l'actine qui se compose de la G-actine assemblée en filaments qui, enroulés deux par deux dans une hélice, forment des microfilaments d'actine d'un diamètre d'environ 7 nm, tel qu'illustré à la Figure 1, B. Ces microfilaments possèdent une extrémité positive où l'ajout de monomères d'actine est favorisé et une extrémité négative où la perte des monomères d'actine est favorisée<sup>7</sup>. Cet échange est contrôlé par l'hydrolyse de l'ATP en ADP<sup>7</sup>. La F-actine est caractérisée par la liaison au GTP tandis que les monomères de G-actine lient plutôt le GDP<sup>7</sup>. Des mutations spécifiques peuvent causer des défauts de polymérisation. Ces mutations déstabilisent les interactions entre les monomères de G-actine ou perturbent l'hydrolyse de l'ATP en ADP<sup>8</sup>. Les filaments d'actine jouent un rôle important dans l'organisation de la membrane plasmique et donnent la forme à la cellule<sup>3</sup>. Ces filaments peuvent aussi interagir avec la myosine et fournissent ainsi une activité contractile importante pour le fonctionnement des muscles et pour la division cellulaire<sup>3</sup>.

#### 1.1.3.1 La dynamique des filaments d'actine

L'actine est une protéine hautement conservée qu'on retrouve en abondance dans les cellules. La polymérisation de ces filaments dépend tout d'abord de la concentration ionique et la présence d'ATP/ADP<sup>2</sup>. Chaque unité de G-actine est capable de lier une molécule d'ATP, ou d'ADP, et un ion  $Mg^{2+}$ . Sans la liaison du nucléotide à son site de liaison, on observe la dénaturation rapide de la G-actine<sup>3</sup>. La polymérisation de l'actine peut être observée *in vitro* où l'ajout de cation ( $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) favorise la forme filamenteuse<sup>3</sup>.

La polymérisation de l'actine *in vitro* peut être séparée en 3 phases : la nucléation, l'élongation et l'état stable<sup>3</sup>. La nucléation est la phase déterminante de la vitesse d'assemblage

et est caractérisée par l'assemblage lent des sous-unités de G-actine en dimères et trimères <sup>7</sup>. Les trimères peuvent alors servir de noyau et permettent l'élongation, qui aboutit à l'ajout des monomères d'actine aux deux extrémités<sup>9</sup>. La concentration de monomères de G-actine dans le cytoplasme diminue ainsi jusqu'à l'atteinte d'un équilibre, caractérisé par l'échange continu de monomères aux extrémités des filaments sans variation dans leur taille<sup>3</sup>. La concentration critique est alors atteinte lors de cet équilibre <sup>7</sup>. Cette concentration est différente aux deux extrémités, et un effet de « tapis roulant » est observé à l'état stable. L'ATP-actine est donc préférentiellement ajouté à l'extrémité positive, sans qu'il n'y ait un changement dans la vitesse de dissociation à l'extrémité négative <sup>3</sup>.

Les monomères d'actine gardent tous la même orientation lors de l'assemblage d'un filament et on observe alors une polarité où une des extrémités est différente de l'autre (extrémités positive et négative comme mentionnée plus haut). Des monomères d'ATP-G-actine s'ajoutent presque 10 fois plus rapidement à l'extrémité positive comparativement à l'extrémité négative <sup>3</sup>.

### **1.1.3.2 Les modulateurs de la polymérisation des filaments d'actine**

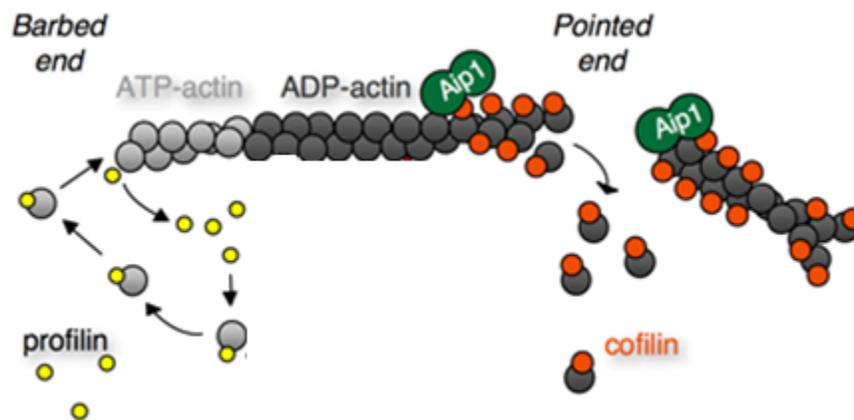
Le processus de « tapis roulant » peut être accéléré *in vivo* à l'aide des protéines modulatrices comme la profiline et la cofiline. La profiline se lie à la G-actine et favorise l'échange de l'ADP pour de l'ATP, tel qu'illustré à la Figure 2 <sup>7</sup>. Le complexe profiline-ATP-actine peut se lier uniquement à l'extrémité positive ou barbue, car la liaison de la profiline bloque le site de liaison nécessaire à l'ajout des monomères d'actine à l'extrémité négative ou pointue <sup>7</sup>. Une fois que le complexe se lie à l'extrémité positive, la profiline se dissocie à l'ajout d'une nouvelle sous-unité, tel qu'illustré à la Figure 2. Cette protéine augmente ainsi le réservoir d'actine liée à l'ATP disponible dans le cytoplasme <sup>7</sup>. De plus, la profiline peut lier simultanément des séquences riches en prolines sur d'autres protéines modulatrices <sup>7</sup>.

La cofiline lie spécifiquement les sous-unités de F-actine liées à l'ADP (sous-unités plus vieilles dans un filament proche de l'extrémité négative <sup>7</sup>. La cofiline se lie en faisant un pont entre deux sous-unités d'actine, ce qui induit un changement dans l'enroulement du filament suivi d'une cassure, tel qu'illustré à la Figure 2 <sup>7</sup>. Ceci mène à une plus grande abondance

d'extrémités négatives libres, et augmente ainsi la vitesse de désassemblage<sup>3</sup>. De cette manière, ces deux protéines peuvent modifier la vitesse critique de l'actine dans la cellule<sup>3</sup>. De plus, la protéine AIP1, qui lie aussi l'actine, peut contribuer à la déstabilisation des filaments d'actine. Cette protéine se lie aux extrémités positives des fragments générés par la cofiline et empêche leur élongation, tel qu'illustré à la Figure 2<sup>10</sup>.

Il existe des protéines qui facilitent l'étape de nucléation lors de la polymérisation de l'actine. Les formines sont une famille diverse de protéines qui possèdent un domaine FH2 conservé (formin homology 2), capable de se dimériser qui aide l'ajout de sous-unités d'actine à l'extrémité positive du filament naissant<sup>11</sup>. Les formines possèdent aussi un domaine FH1 (formin homology 1) adjacent riche en résidus proline qui peut faciliter l'élongation du filament en interagissant avec la profiline<sup>9</sup>. Des longs filaments non ramifiés sont ainsi formés qui jouent un rôle dans la formation des fibres de stress, les filopodes et l'anneau contractile lors de la division cellulaire<sup>11</sup>.

Il existe d'autres protéines comme le complexe Arp2/3 qui permettent la nucléation des filaments d'actine ramifiés. Le complexe Arp2/3 est formé de 7 sous-unités et est activé en interagissant avec un facteur de promotion de la nucléation (NPF)<sup>11</sup>. Une fois activé, le complexe Arp2/3 lie le côté d'un filament d'actine préexistant et permet le branchement et l'élongation du nouveau filament sous un angle spécifique de 70°<sup>11</sup>. Ce type de filament joue un rôle important dans la motilité intracellulaire utilisée par certaines bactéries comme *Listeria*<sup>9</sup>.



## **Figure 2. Les modulateurs de la polymérisation de l'actine**

On retrouve certaines protéines *in vivo* qui peuvent influencer les dynamiques d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine. La profiline favorise l'élongation de l'extrémité positive (l'extrémité barbue), tandis que la cofiline et la protéine AIP1 agissent ensemble en déstabilisant les filaments d'actine<sup>12</sup>.

### **1.1.3.3 Le mutant non polymérisable de l'actine**

L'actine, composée de quatre sous-domaines, s'organise en deux lobes séparés par une fente qui peut accommoder la liaison du nucléotide et un ion divalent. Sa conformation s'adapte à la liaison de l'ATP ou de l'ADP<sup>13,14</sup>. La liaison de l'ATP stabilise la forme polymérisée de l'actine (F-actine), tandis que la liaison de l'ADP favorise la forme monomérique de l'actine (G-actine)<sup>13</sup>. Certaines mutations de la  $\beta$ -actine mènent à des défauts dans la polymérisation. Ces mutations perturbent l'interaction entre les sous-domaines d'actine lors de la polymérisation en mutant soit des résidus de surface, soit l'architecture de la poche de liaison à l'ATP/ADP. Deux mutants avec des forts défauts de polymérisation ont été identifiés par le laboratoire de Richard Treisman. Le mutant R62D, aussi connu comme le mutant de charge inversée, présente des défauts dans un pont de sel entre les sous-domaines deux et quatre et le mutant G13-S/T14-G15, qui affecte la poche de liaison du nucléotide, et perturbe les changements conformationnels nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP. Ces deux mutants sont complètement solubles *in vivo* et ne se localisent pas la F-actine, ce qui indique qu'ils ne sont pas intégrés dans les réservoirs de F-actine de la cellule<sup>8</sup>.

### **1.1.4 Les septines**

Les septines sont vues comme une quatrième composante du cytosquelette cellulaire à cause de leur apparence filamenteuse. Elles forment aussi des complexes hétéro-oligomériques qui peuvent polymériser et former des filaments, des anneaux, et des tamis<sup>5</sup>. De plus, elles interagissent avec plusieurs protéines, la membrane plasmique, les microtubules et le cytosquelette d'actine. Ces protéines agissent comme protéines d'échafaudage et comme barrière

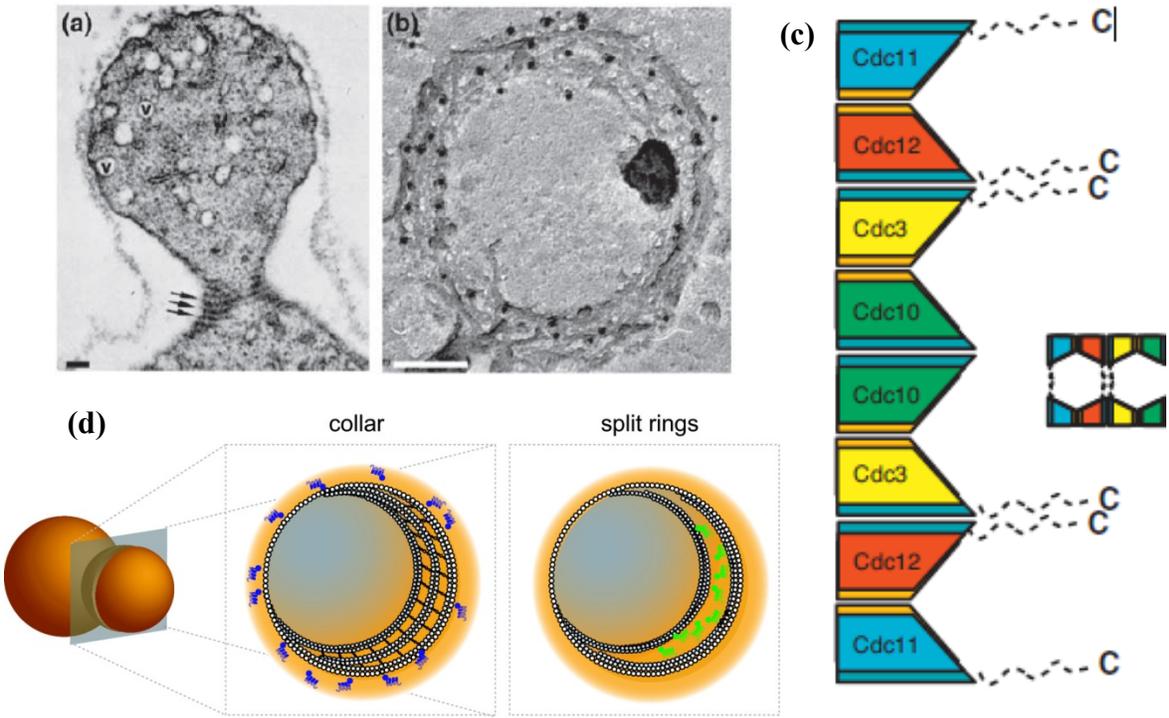
de diffusion (cils, spermatozoïdes, membrane plasmique). Elles sont aussi impliquées dans la division cellulaire.

## 1.2 Les septines dans les organismes modèles

### 1.2.1 Les septines chez la levure bourgeonnante

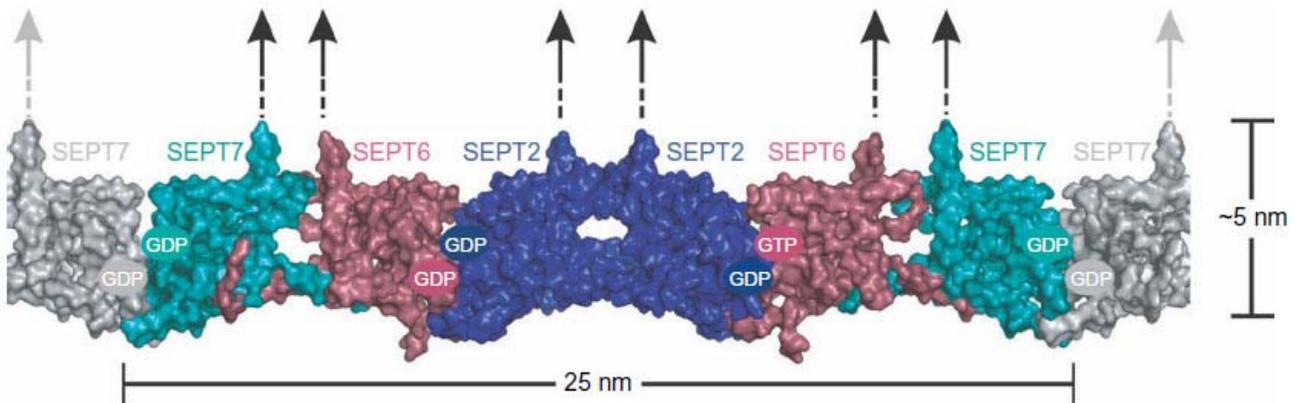
Une nouvelle composante du cytosquelette a émergé, découverte il y a 40 ans, chez la levure bourgeonnante : *Saccharomyces cerevisiae*<sup>5</sup>. Cette découverte est au nom de Lee Hartwell qui s'intéressait à des gènes possiblement impliqués dans la division cellulaire. Il a identifié 4 nouveaux gènes (*cdc3*, *cdc11*, *cdc12*, *cdc13*) en utilisant des mutants sensibles aux changements de température. Ces gènes s'avèrent indispensables pour la dernière étape de la division cellulaire, appelée la cytokinèse<sup>15</sup>. Les mutants délétères de ces gènes progressent normalement pendant la réplication de l'ADN et la division nucléaire, mais démontrent des défauts dans les phases terminales de la division<sup>16</sup>. John Pringle a ensuite étudié la localisation des protéines transcrites à partir de ces gènes en microscopie à fluorescence. Elles se localisent au site de division, ce qui leur a valu le nom : septines<sup>17</sup>. Les septines forment un anneau (septum) au site de division pendant la phase de croissance isotropique (croissance uniforme) qui sert comme barrière de diffusion au cou du bourgeon. Cette barrière sert à définir les compartiments membranaires distincts et la localisation de différents facteurs, ce qui induit la croissance anisotrope (croissance non uniforme) du bourgeon<sup>18</sup>. Suite à la division nucléaire et à la répartition des organelles, le septum se sépare en deux et la cytokinèse a lieu, tel qu'illustré à la Figure 3, C<sup>18</sup>. Les septines sont alors importantes pour l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire pendant la division cellulaire chez la levure. Des mutations dans ces gènes perturbent le fonctionnement des septines nécessaire pour surmonter le point de contrôle, permettant le passage de la phase de croissance isotropique à la phase de croissance anisotrope<sup>17</sup>. Ces mutants sont caractérisés par des bourgeons allongés binucléés qui ne sont pas capables de compléter la cytokinèse<sup>17</sup>. Le cou du bourgeon a une apparence striée en microscopie électronique et se compose de filaments d'environ 10 nm d'épaisseur, Figure 3, B<sup>19</sup>. Les septines semblent jouer un rôle dans l'organisation de ces filaments et l'organisation de la

surface cellulaire tout en orchestrant les interactions entre la membrane plasmique et les composantes du cytosquelette<sup>20</sup>. La mutation des différentes septines (cdc3, cdc11, cdc12 ou cdc13) mène au même phénotype, ce qui suggère la formation d'un complexe. J. Frazer s'est intéressé à cette possibilité et a réussi à purifier et caractériser un tel complexe chez la levure<sup>21</sup>. À l'aide d'un anticorps PVP contre 14 acides aminés à l'extrémité C terminal de Cdc3p, il a isolé un complexe de septines contenant 4 protéines de poids moléculaires différents (70 kDa, 63 kDa, 50 kDa et 37 kDa)<sup>21</sup>. Elles ont été identifiées par spectrométrie de masse : Cdc3, Cdc10p, Cdc11p et Cdc10p respectivement<sup>21</sup>. Ces quatre septines s'assemblent en ratios stœchiométriques (1 :1 :1 :1) et forment des complexes octamériques linéaires qui possèdent 2 copies de chaque septine organisées dans l'ordre suivant : Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11, tel qu'illustré à la Figure 3, D<sup>21</sup>. Ces complexes sont donc symétriques et peuvent s'assembler bout à bout pour former des filaments non polaires à des concentrations salines basses qu'on retrouve physiologiquement ( $\leq 100\text{mM}$ )<sup>21</sup>. De tels filaments chez la levure sont caractérisés par un diamètre entre 7-9 nm et par une périodicité à chaque 32 nm, correspondant à la longueur du complexe de base<sup>21</sup>. On peut alors se demander si la formation de ces filaments est nécessaire pour le fonctionnement des septines. Il est connu que des mutants  $\Delta\text{cdc3}$  et  $\Delta\text{cdc12}$  (délétères pour ces gènes) ne sont pas viables chez la levure et présentent des défauts de cytokinèse<sup>22</sup>. Par contre, des mutants  $\Delta\text{cdc10}$  et  $\Delta\text{cdc11}$  présentent des défauts de polymérisation, mais restent viables<sup>22</sup>. Ces septines ne sont donc pas essentielles, mais il a été démontré qu'elles ont un rôle à jouer lors de la sporulation<sup>22,23</sup>. Ces mutants causent des filaments perturbés au site de bourgeonnement et des anneaux de septines diffus et discontinus ou même parfois absents<sup>22</sup>. Par contre, dans les cas où les septines s'y localisent proprement, il y a recrutement de protéines importantes pour la spécification du site de division, comme Bud4p, et un bourgeonnement axial normal, ce qui suggère que leur localisation peut suffire pour permettre la progression de la cytokinèse<sup>22</sup>.



### Figure 3. Les septines chez la levure bourgeonnante

A) et B) Image en microscopie électronique du collier de septines au site de division composé de filaments hautement organisés et compactés C) Les septines forment un collier au site de division, qui se sépare en 2 anneaux lors de la cytokinèse ce qui permet la séparation des deux cellules D) Octamère de septines, non polaire, composé de Cdc11, Cdc12, Cdc3 et Cdc10 chez la levure bourgeonnante<sup>24-26</sup>.



## **Figure 4. La structure cristalline de l'hexamère de septines purifié chez l'humain**

Deux copies de chaque septine s'organisent d'une manière symétrique pour donner un hexamère<sup>27</sup>.

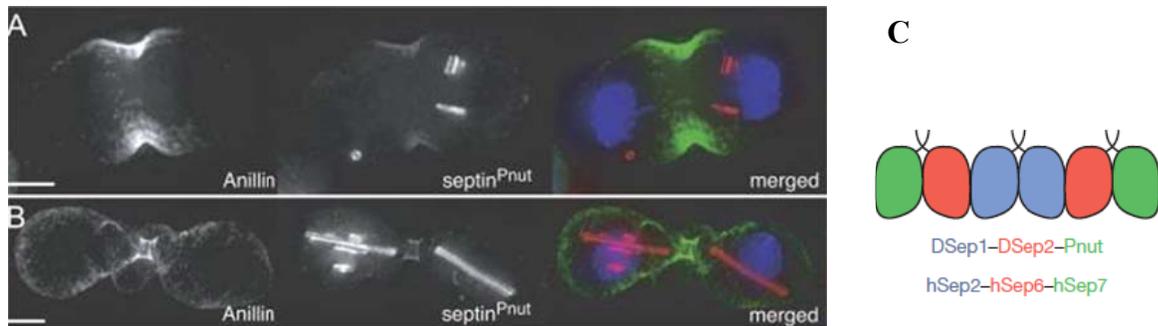
### **1.2.2 Les septines chez l'humain**

Les septines peuvent être classifiées dans 4 catégories différentes selon l'homologie de leurs séquences. Ces catégories portent le nom des septines fondatrices : Sept2, Sept3, Sept6 et Sept7. Sept7 est le seul membre de sa catégorie et est exprimé uniformément dans toutes les cellules. Tous les vertébrés présentent des protéines homologues<sup>28,29</sup>. Un complexe de septines a aussi été purifié chez l'humain comme illustré à la Figure 4. L'organisation des septines dans ce complexe est conservée comme décrite plus haut. Il se compose de Sept2, Sept6 et Sept7, qui forment un hexamère. La structure cristalline de ce complexe a été résolue avec une résolution de 4 Å. Il semble aussi que Sept9 peut se lier aux extrémités du complexe pour former un octamère<sup>30-32</sup>. Il n'est pas encore clair ce qui détermine l'assemblage de l'hexamère par rapport à l'octamère, ni s'ils ont des rôles différents. De plus, on peut penser que les composantes du complexe sont interchangeable avec des septines du même groupe et qu'il existe une diversité de complexes hétérogènes dans les tissus. Les septines humaines peuvent aussi polymériser et former des structures hautement organisées. Leur polymérisation est induite par des signaux cellulaires comme ceux qu'on observe lors des points de contrôle pendant la division cellulaire.

### **1.2.3 Les septines chez la *Drosophila***

Le grand nombre de gènes de septines, leurs profils d'expression variables selon les tissus et le grand nombre d'isoformes suite à un épissage alternatif complexe, compliquent énormément leur étude<sup>18</sup>. La *Drosophila* est un organisme modèle simple où on retrouve seulement 5 gènes de septines (Sep1, Sep2, Pnut, Sep4, Sep5) et seulement 2 de ces gènes

présentent une isoforme (Sep2 PA et PB ; Sep4 PA et PG). Christine Field a été la première à purifier un complexe de base chez la *Drosophila* à partir des préparations embryonnaires purifiées ou à partir des embryons isolés. Comme chez la levure, des mutations dans le gène *pnut* (expression ubiquitaire) mènent à des défauts de cytokinèse. Un complexe hexamère a été isolé par immunoaffinité, à l'aide d'un anticorps KEKK contre 14 acides aminés au C-terminal de Pnut (NVDGKKEKKKKGLF). Cette séquence est spécifique à la septine Pnut et a été utilisée comme marqueur spécifique pour le sillon de clivage lors de la division cellulaire. Trois septines participent au complexe de base chez la *Drosophila* : Pnut (60 kDa), Sep1 (38 kDa) et Sep2 (46 kDa). Par immunobuvardage, on peut voir qu'elles y sont présentes en ratio stœchiométrique (1 :1 :1). Ces septines sont concentrées à 90%-100% dans le précipité suite à l'ajout de PEG, cosédimentent à 8 +/- 0.2 S suite à une sédimentation par gradient de sucrose, et éluent simultanément dans un pic, à partir d'une colonne de chromatographie sur gel, ce qui supporte fortement l'hypothèse de la formation d'un complexe. La masse du complexe est estimée à 340 kDa (2 copies de chaque septine<sup>20</sup>). Ces complexes peuvent aussi polymériser et former des filaments linéaires de 7-9 nm de diamètre avec une périodicité de 26 nm, qui correspond à la longueur du complexe de base. Ces filaments peuvent aussi former des structures hautement organisées comme des câbles et agrégats à des hautes concentrations de septines. De telles structures peuvent être observées dans des cellules S2 de *Drosophila*, non transfectées, fixées avec du formaldéhyde et marquées en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps contre Pnut. Ce marquage permet d'observer des structures massives de haute intensité dans le cytoplasme de ces cellules, tel que démontré par la Figure 5, A, B. Pnut se localise aussi au sillon de clivage, où elle interagit avec l'extrémité C terminal de l'anilline qui permet son recrutement (Kechad, Jananji, Ruella et Hickson, 2012), à proximité de la membrane plasmique et de la myosine pour permettre la bonne organisation du corps central, tel qu'illustré à la Figure 5, A, B.



**Figure 5. L'hexamère de base et la formation des structures hautement organisées de septines chez la *Drosophile*.**

A et B, Pnut se localise au sillon de clivage et dans des structures massives de haute intensité. Cellules S2 non transfectées fixées au formaldéhyde et marquées avec des anticorps contre l'anilline (vert) et Pnut; objectif 63X, échelle 5  $\mu\text{m}$  c) Hexamère composé de 2 copies de chaque septine (Sep1, Sep2 et Pnut) organisées d'une manière symétrique<sup>33,34</sup>.

## 1.3 Structure

### 1.3.1 Motifs et Domaines protéiques

Les septines sont hautement conservées chez les eucaryotes<sup>17</sup>, mais sont absentes chez les plantes<sup>18</sup>. Ceci peut être expliqué par la formation de phragmoplastes, voie alternative de cytokinèse observée chez les plantes qui possèdent une paroi cellulaire<sup>18</sup>. Le nombre de gènes de septines varie énormément d'un organisme à un autre de seulement deux chez *C. elegans*, à sept chez la levure et douze chez l'humain. Ces protéines présentent au moins 26% d'homologie au long de leur séquence d'acides aminés. Elles font partie de la large superfamille de protéines avec activité GTPase possédant une boucle-P. Cette boucle, caractérisée par les motifs de Walker A ou G1 (GxxGxGKST), B ou G3 (DxxG) et motif spécifique au GTP ou G4 (xKxD), leur permet de se lier au GTP et de l'hydrolyser<sup>17</sup>. Le motif G1 forme la boucle P et interagit directement avec le nucléotide, tandis que les motifs G3 et G4 sont essentiels pour la liaison au

Mg<sup>2+</sup> et confèrent la spécificité de liaison au GTP plutôt qu'à d'autres nucléotides<sup>29</sup>. Plus spécifiquement, les septines appartiennent à la sous-division TRAFAC, car elles contiennent une thréonine conservée essentielle à la propre hydrolyse du GTP en GDP<sup>18</sup>. Par contre, elles se distinguent par le fait qu'elles ne possèdent pas d'asparagine à la position 1 de leur motif C (AKAD ou GKAD). Il n'est pas encore clair si la fonction GTPase des septines module leurs fonctions dans la cellule en régulant leur assemblage en complexes et leur polymérisation en filaments. Chaque septine contient aussi un élément unique aux septines composé de 50 acides aminés fortement conservés importants à l'association des monomères<sup>27</sup>. La plupart des septines possèdent aussi un domaine surenroulé C-terminal d'environ 50-100 acides aminés qui sert aux interactions protéiques et pourrait aussi être important en synergie avec le domaine de liaison au GTP pour la polymérisation des septines en filaments. Ces protéines possèdent aussi un domaine polybasique qui leur permet d'interagir avec la membrane plasmique à travers les phospholipides.

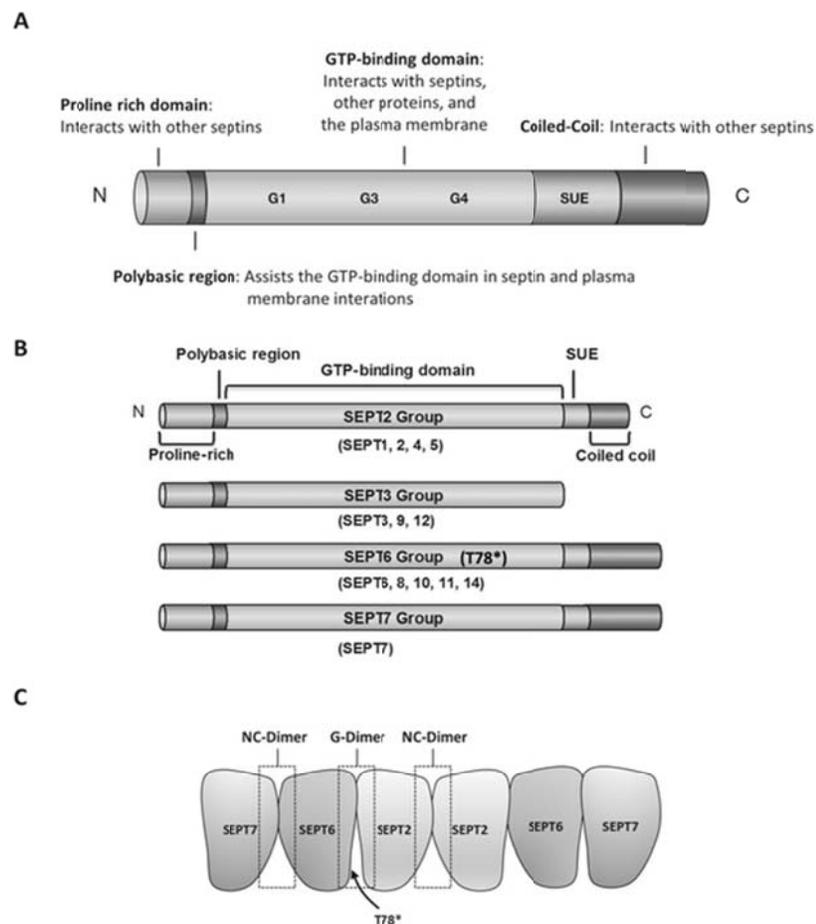
### 1.3.2 Interfaces G et NC

La structure du domaine de liaison au GTP de Sept2 chez l'humain a servi comme modèle pour l'étude des interactions retrouvées lors de la polymérisation du complexe de base (Sept2-Sept6-Sept7). Sept2 recombinant, doté d'une troncation dans le domaine surenroulé C-terminal, a été purifié de bactéries (*E. coli*) et se retrouve sous forme de dimère (72 kDa) ou de monomère (36 kDa)<sup>27</sup>. La même chose est observée suite à la purification du Sept2 recombinant de *Xenopus* à partir des bactéries<sup>35</sup>. Il semble que la formation des complexes de septines ne requière pas nécessairement plusieurs septines différentes<sup>35,36</sup>. Il a aussi été suggéré que certaines septines sont interchangeable dans le complexe, et plusieurs complexes hétérogènes peuvent exister dans un même organisme selon leur disponibilité.

Deux interfaces de liaison sont possibles lors de la dimérisation de Sept2 : l'interface G et l'interface NC, tel qu'illustré à la Figure 6, C. L'interface G se compose de la boucle P qui stabilise les phosphates, négativement chargés, et le motif AKAD, qui interagit avec la guanine spécifiquement. L'interface NC se compose des extrémités N (variable) et C (domaine surenroulé) terminales. Seulement des mutations dans l'interface G (Phe156Asp, Trp260Ala +

His270Asp) déstabilisantes pour la liaison du GTP/GDP déplacent l'équilibre entre la forme dimère et monomère. Cette interface permet donc la dimérisation de Sept2 *in vitro*. Cet équilibre dépend aussi de la nature du nucléotide plutôt que de sa présence. L'ajout de GDP ou de GppNHp (hydrolyse lente) favorise la forme dimère ou monomère respectivement.

*In vivo*, Sept2 participe plutôt dans un complexe hexamère (285kDa) avec Sept6 et Sept7. Ce complexe est asymétrique et est formé de deux trimères (Sept2-Sept6-Sept7) qui interagissent ensemble par l'interface NC de Sept2, contrairement à ce qu'on observe plus haut avec le dimère. Sept2 et Sept6 interagissent par leurs interfaces G, tandis que Sept6 et Sept7 interagissent par leurs interfaces NC, tel que démontré par la Figure 6, C (alternation des interfaces).



**Figure 6. La structure élémentaire et les interfaces d'interaction des septines**

A) Structure élémentaire des septines B) Familles de septines C) Interfaces NC (extrémités N et C terminales) et G (GTP-binding domain)

### 1.3.3 Le rôle du GTP/GDP dans la polymérisation des septines

Ces hexamères lient le GDP et GTP dans un ratio de 2 :1 et contient donc du GDP et du GTP <sup>35</sup>. Chez l'humain, Sept2 et Sept7 tiennent une molécule de GDP hydrolysée, tandis que Sept6 ne possède pas la capacité d'hydrolyser le GTP en GDP et reste lié au GTP non hydrolysé. Ceci ne déstabilise pas son interaction avec les septines avoisinantes dans le complexe. De plus, la délétion des domaines surenroulés C-terminaux (Sept2 1-308, Sept6 1-310, Sept 1-305) ne perturbe pas la formation du complexe hexamérique humain. Par contre, des mutants  $\Delta$  cc-Sep2 de *Xenopus* présentent une diminution de leur efficacité de polymérisation <sup>35</sup>. Ces hexamères s'assemblent bout à bout et forment des anneaux, et des filaments (4-5 nm larges) à des concentrations salines basses et des filaments courts et uniformes à des hautes concentrations salines chez l'humain. Ces complexes ne sont pas parfaitement linéaires et sont donc assez flexibles pour permettre la formation des anneaux et filaments courbés. L'interaction entre Sept7 d'un complexe et celui d'un autre est clé dans la formation de ces structures hautement organisées. Cette interaction par leur interface G est sensible aux variations salines, contrairement aux interactions observées entre les autres septines du complexe. Ceci peut être expliqué par le fait que l'interface G dans un dimère (i.e. : Sept7-Sept7) est moins stable qu'une interface G dans un hétérodimère (i.e. : Sept6-Sept7), ou par la nature du nucléotide lié, soit GDP-GDP ou au GTP-GDP respectivement. La formation des filaments par d'autres protéines comme l'actine et les microtubules est dépendante de l'échange et l'hydrolyse du nucléotide lié soit ATP/ADP ou GTP/GDP <sup>35</sup>. Dans le cas des septines, la formation de filaments requiert la présence du GTP ou un analogue non hydrolysable (GTP gamma S). La présence du GTP $\gamma$ S déplace l'équilibre vers la formation de polymères, et la présence de GDP fait le contraire <sup>35</sup>. Ceci peut être expliqué de deux façons, soit que la liaison du GTP a un effet stabilisant par rapport à la liaison du GDP, ou les monomères liés au GTP ont une plus grande affinité de liaison aux filaments existants par rapport aux monomères liés au GDP en solution <sup>35</sup>. L'hydrolyse du GTP n'est donc pas nécessaire pour la polymérisation des septines <sup>35</sup>.

### **1.3.4 Modifications post traductionnelles**

Plusieurs modifications post-transcriptionnelles ont été observées chez les septines. Elles sont acétylées, phosphorylées et peuvent être SUMOylées. Ces modifications ne semblent pas être conservées sur des résidus spécifiques entre les différentes septines. Celles d'entre elles les plus conservées se situent dans l'interface G, et modulent l'assemblage des polymères de septines et leur stabilité. Les autres modifications sont aléatoirement distribuées dans les séquences N terminales et C terminales variables, et régulent la formation des structures hautement organisées spécifiques aux différents organismes<sup>26</sup>.

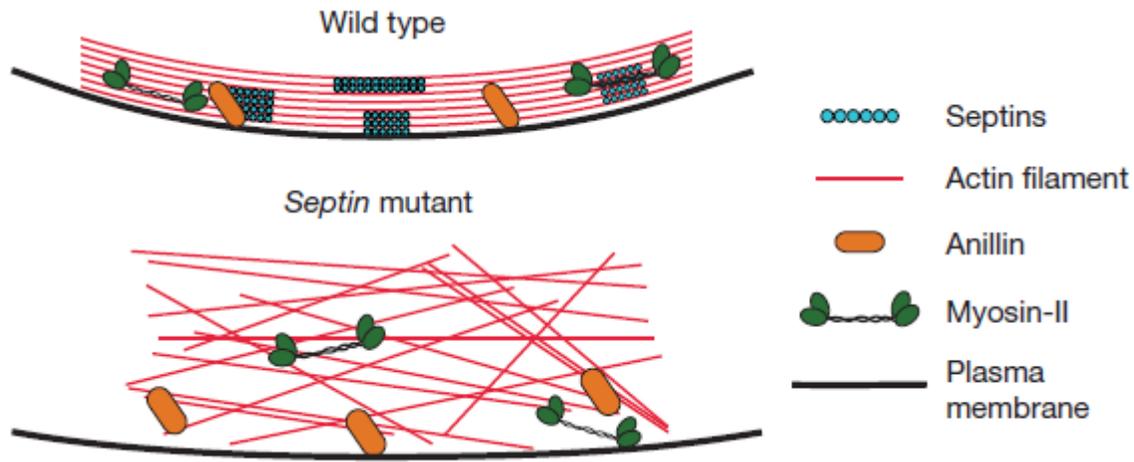
## **1.4 La relation avec l'actine**

### **1.4.1 Les septines et le cytosquelette d'actine lors de la division**

Le rôle des septines pendant la cytokinèse et leur mécanisme d'action ne sont pas très bien compris. Les septines interagissent avec l'anilline (protéine qui lie l'actine au sillon de clivage) à travers son domaine PH et sont alors recrutées au sillon contractile lors de la division. On y retrouve aussi toute la machinerie contractile composée de la myosine et des filaments d'actine. Ces filaments d'actine dans l'anneau contractile permettent le pincement de la membrane plasmique et ainsi la séparation des deux cellules filles. Plusieurs rôles sont possibles dans le cas des septines : elles peuvent servir de barrière de diffusion entre les deux cellules filles, elles peuvent servir à ancrer la machinerie contractile à la membrane plasmique par leur interaction avec l'anilline, ou encore, elles peuvent servir à organiser et plier les filaments d'actine dans l'anneau contractile. Une interaction directe entre la F-actine et les septines a été démontrée récemment<sup>34,37</sup> ce qui suggère un lien entre les deux. Le mécanisme d'interaction entre ces deux protéines est présentement sujet à plusieurs études.

## 1.4.2 Les septines comme modulateurs de l'actine

La cellularisation chez l'embryon de *Drosophila* est un processus très semblable à la cytokinèse cellulaire. Lors de la cellularisation, on observe l'invagination de la membrane plasmique entre les noyaux du syncytium embryonnaire pour former un grand nombre de cellules épithéliales polarisées<sup>20,38</sup>. Le front de la membrane plasmique est constitué de l'anilline, la myosine II (non musculaire), les septines et la F-actine qui composent aussi l'anneau contractile pendant la division cellulaire. Les septines peuvent lier l'anilline, la membrane plasmique et la myosine II<sup>39,40</sup>. Des mutants nuls pour *pnut* présentent un délai d'invagination pendant la phase rapide avec une diminution des niveaux de myosine et un délai dans l'accumulation de l'actine au front membranaire. Ces mutants présentent des défauts dans l'organisation de l'actine, qui forme des structures polygonales et des filaments peu étanches à la place des anneaux au front membranaire en absence de septines. Les septines permettent l'organisation et la compaction du cytosquelette d'actine lors de l'événement de cellularisation<sup>34</sup>. Des complexes de septines recombinantes DSep1-DSep2-Pnut/hSep7 purifiés de bactéries sont capables de lier les filaments d'actine (F-actine) avec une constante de dissociation de 1,2 +/- 0,5  $\mu$ M. Cette constante est semblable à celle de certains modulateurs de l'actine comme le Fascin, la Filamine et l'alpha-Actinin (0,1 à 1,5  $\mu$ M), ce qui supporte l'idée des septines en tant que modulateurs de l'actine. En absence de septines l'actine forme des filaments linéaires. La présence des septines (plus grand que 0,05  $\mu$ M) permet leur compaction et assemblage de structures sphériques comme des anneaux, des boucles et des lassos. Les septines en solution sous forme non polymérisée (concentration saline 300 mM KCl ; concentration septines « 0,2  $\mu$ M) décoorent et plient les filaments d'actine *in vitro*. À des concentrations de septines plus hautes, on observe un mélange de filaments d'actine droits et pliés.



**Figure 7. L'effet des septines sur l'organisation de l'actine (*in vivo*) dans les canaux du sillon lors de la cellularisation chez la *Drosophile***

Le mutant nul de *pnut* cause un cytosquelette d'actine désorganisé et éparpillé<sup>34</sup>.

### 1.4.3 Les drogues qui influencent le cytosquelette d'actine

Il existe plusieurs drogues qui peuvent soit stabiliser ou déstabiliser le cytosquelette d'actine. Ici on se concentre sur le mécanisme d'action de deux d'entre elles soit, la Latrunculin A et la Jaspalakinolide.

La **Latrunculine A** est isolée à partir de l'éponge de mer rouge *Latrunculia magnificans* qui relâche une substance rouge capable de tuer un poisson en quelques minutes. Cette molécule affecte le cytosquelette d'actine spécifiquement avec un temps d'action très rapide. Cet effet est réversible après lavage de la drogue. Cette drogue présente un mécanisme significativement plus simple que les drogues traditionnellement utilisées comme le Cytochalsin D. Contrairement au Cytochalsin-D qui affecte la cinétique de polymérisation des filaments d'actine, la Latrunculin A lie les monomères de G-actine ce qui empêche leur polymérisation. Il est possible de rendre l'actine résistante à cette drogue en introduisant un nombre de mutations dans un site à proximité du site de liaison à l'ATP/ADP. Cette interaction semble empêcher l'échange de nucléotide et les changements conformationnels nécessaires lors de l'assemblage de l'actine en filaments<sup>41</sup>.

La **Jasplakinolide** est un peptide cyclique, isolé à partir de l'éponge de mer *Jaspis johnstoni*, qui stabilise le cytosquelette d'actine *in vitro*. Cette drogue augmente le taux de nucléation de l'actine en diminuant la taille de l'oligopeptide nécessaire à l'initiation de ce processus. Trois sous unités d'actine à la place de quatre sont alors suffisantes pour permettre la polymérisation des filaments d'actine. La Jasplakinolide lie l'interface de ces trois monomères d'actine ce qui facilite la nucléation. Ainsi, la concentration de G-actine diminue significativement. *In vivo*, le traitement avec la Jasplakinolide empêche le marquage de F-actine à l'aide de la sonde phalloïdine, car elles se lient compétitivement à l'actine<sup>42,43</sup>.

#### **1.4.4 Lien entre les septines et le cytosquelette d'actine**

Sept2 peut être observée dans des structures granulaires ou fibreuses proches des structures d'actine dans les fibres de stress, les lamellipodes et les filopodes qu'on retrouve dans les fibroblastes mammifères et les cellules de neuroblastome de souris, N18<sup>44</sup>. La déstabilisation des fibres d'actine par mutation de Ras, un apport nutritif bas, un traitement avec le Cytochalasin D ou le Botulinus C3 exo-enzyme mènent tous à la déstabilisation des septines sous forme fibreuse seulement. Normalement, les septines colocalisent avec les fibres linéaires, les arcs au cortex et des fibres épaisses en dessous de l'enveloppe nucléaire. Cette colocalisation est perturbée rapidement après l'ajout du Cytochalasin D ou de la Jasplakinolide, inhibiteurs de la polymérisation d'actine. Les septines se réorganisent en anneaux cytoplasmiques d'un diamètre de 0,66 +/- 0,08 µm, qui semblent être une forme de stockage que les septines adoptent naturellement. Ce processus est réversible 20 minutes après lavage des drogues. Un complexe de base a aussi été isolé chez les mammifères, à partir des cellules HeLa et des cerveaux de souris, composé de Sep2, Sep6 et Sep7. Ces protéines peuvent aussi être co-exprimées dans des cellules d'insecte par infection virale (baculovirus) et peuvent être purifiées en complexe (2 :2 :2) dans des ratios stœchiométriques comme chez la *Drosophila*<sup>20</sup> et la levure<sup>21</sup>. Ces complexes forment des courts filaments d'un diamètre d'environ 7 nm à des concentrations salines entre 0,1-0,5 M KCl, mais forment des structures surenroulées et des anneaux à des concentrations salines plus élevées (Kinoshita, Field, Coughlin, Straight et Mitchison, 2002). Ces anneaux présentent un diamètre de 0.68 +/- 0.09 µm quand examinés par fluorescence, et un diamètre de 0.51 +/- 0.07 µm quand examinés par microscopie électronique. Ces complexes ne présentent pas une forte

affinité pour les filaments d'actine, ce qui suggère un recrutement indirect, coordonné par une protéine adaptatrice. L'Anilline a été proposée comme médiateur de cette interaction, car cette protéine peut à la fois compacter les filaments d'actine linéaires et recruter les complexes de septines. Le domaine PH à l'extrémité C terminal de l'anilline est responsable de son interaction avec les septines, tandis qu'une région à l'extrémité N terminale est importante pour sa liaison avec l'actine. Cette protéine se trouve à être nucléaire dans des cellules en interphase et ne peut donc promouvoir l'interaction entre les septines et l'actine que lors de la division cellulaire au clivage du sillon. Des expériences avec ARNi dans des cellules NIH3T3 indiquent un rôle des septines dans la stabilisation des filaments d'actine, surtout dans les fibres épaisses en dessous de la membrane nucléaire. De plus, leur activité GTPase semble aussi être importante pour leur organisation, car des mutations dans les domaines G1, G2, G3 et l'injection du GTP $\gamma$ S (non-hydrolysable) mènent à la formation des agrégats cytoplasmiques, ou à un signal cytoplasmique diffus<sup>44</sup>.

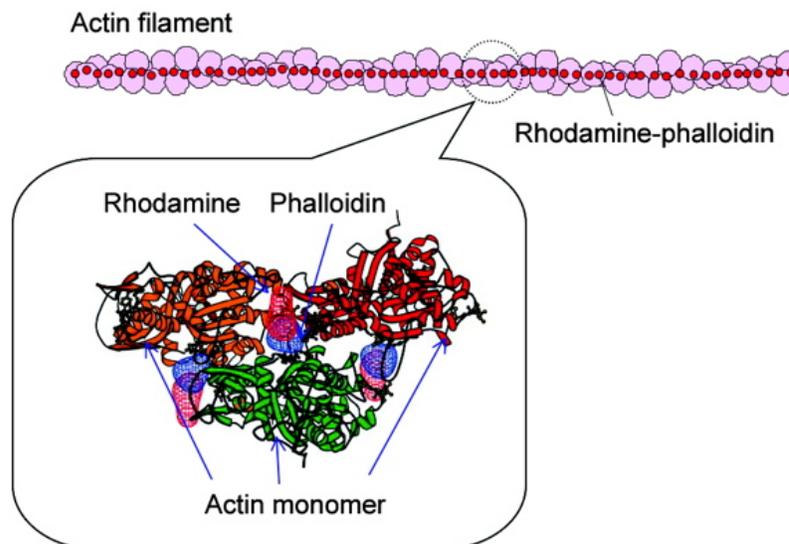
### **1.4.5 Expression différentielle des septines**

Les niveaux d'expression des septines varient selon les différents tissus. Sept4 est fortement exprimé dans le cerveau, mais son expression n'est pas spécifique aux cellules neuronales, car une expression modérée est associée à la rate, les reins, les poumons et les testicules (niveaux d'expression bas détectés dans le pancréas, le foie et le cœur). Par contre, les profils d'expression des différentes septines ne sont pas toujours identiques. Sept2 est exprimé dans tous les tissus avec une forte expression dans le cerveau et très peu dans le cœur. Les différents profils d'expression suggèrent des rôles distincts pour les septines. Sept4 et Sept2 ne forment pas un complexe ensemble, malgré qu'elles colocalisent à l'anneau contractile lors de la division cellulaire et dans les fibres de stress d'actine. Sept4 colocalise parfaitement avec le marquage à la phalloïdine, tandis que Sept2 était absent au cortex et n'était pas présent sur toute la longueur des filaments d'actine. La perturbation du cytosquelette d'actine par Latrunculin B ou Cytochalasin D cause l'agrégation des septines en punctas cytoplasmiques proches de la membrane plasmique. Les agrégats de Sept4 colocalisent parfaitement avec le marquage à la phalloïdine, tandis que Sept2 a été observé dans des structures irrégulières et dans des anneaux

avec une colocalisation partielle avec l'actine. Sept2 se retrouve dans la fraction membranaire, tandis que Sept4 est présent autant dans la fraction membranaire que la fraction contenant les protéines associées au cytosquelette d'actine. La perturbation de l'actine par Latruculin B ne change pas leur distribution, ce qui indique que leur forme filamenteuse n'est pas nécessaire pour leur association avec la membrane plasmique ou avec le cytosquelette d'actine<sup>45</sup>. Les septines ressemblent aux filaments intermédiaires, dû au fait qu'elles forment des filaments non polaires. Par contre, leur rôle n'est pas clairement élucidé. Les septines sont impliquées dans plusieurs processus tels que la division cellulaire, la neurogénèse et la ciliogénèse. Lors de ces processus, les septines agissent comme des protéines d'échafaudage pour le recrutement de nombreuses protéines, mais peuvent aussi former des barrières de diffusion et compartimenter la membrane plasmique<sup>27</sup>.

## 1.5 Sondes de F-actine

La **phalloïdine** est un heptapeptide bicyclique isolé à partir du champignon *Amanita phalloides*. Elle stabilise la F-actine, en inhibant la relâche du phosphate nécessaire pour l'hydrolyse de l'ATP en ADP, ce qui inhibe la dépolymérisation de l'actine<sup>46</sup>. Elle semble se lier au niveau de la fente entre les deux domaines du monomère d'actine<sup>47</sup>. Ce peptide n'est pas perméable à travers la membrane cellulaire. Couplé à la Rhodamine (colorant fluorescent), on l'utilise pour le marquage de la F-actine en microscopie dans des cellules préalablement fixées.



## **Figure 8. L'effet stabilisant de la phalloïdine sur les filaments d'actine**

La phalloïdine se lie aux filaments d'actine et empêche la relâche du phosphate nécessaire à la dépolymérisation<sup>47</sup>.

**LifeAct** est un peptide composé de 17 acides aminés, utilisé pour visualiser le cytosquelette d'actine dans des cellules vivantes. Sa petite taille en fait un excellent marqueur. Couplé au GFP, LifeAct peut être utilisé pour l'étude des filaments d'actine *in vivo*. Il présente une affinité beaucoup plus grande pour la F-actine que pour la G-actine et se lie à un site distinct de celui utilisé par Latrunculin A ou la phalloïdine<sup>48</sup>.

## **1.6 Le Forchlorophenuron (FCF)**

Le FCF est une cytokinine synthétique utilisée en agriculture qui a aussi un effet stabilisant spécifiquement sur le cytosquelette des septines. Cette drogue se lie aux septines sous deux conformations différentes à la surface ou profondément dans la poche de liaison au GTP/GDP. Elle interagit avec le motif de Walker A (GxxxxGKS/T) qui stabilise le phosphate du GTP et le motif (AKAD) qui confère la spécificité au GTP en stabilisant la guanine. Cette interaction stabilise la liaison au GTP et empêche son hydrolyse, ce qui stabilise la formation de structures de septines<sup>49</sup>. Des structures de septines anormalement larges sont observées après traitement avec cette drogue, et cet effet est réversible après lavage de la drogue. En plus de la formation de telles structures, le traitement au FCF induit des défauts de mitose et migration cellulaire aussi causés par la déplétion des septines par ARNi. Cette drogue présente une faible cytotoxicité et ne perturbe pas le cytosquelette d'actine et les microtubules<sup>24</sup>.

## **1.7 Les septines et leur rôle dans la cellule**

### 1.7.1 Protéines d'échafaudage

Les septines sont des protéines d'échafaudage et sont responsables du recrutement de certaines protéines impliquées dans différentes voies cellulaires à des sites et moments spécifiques. Ceci permet leur interaction physique avec des partenaires de liaison et mène à l'exécution de leur fonction<sup>50</sup>. Les septines forment une structure stable qui favorise cette interaction<sup>50</sup>. De telles structures peuvent être observées au site de division cellulaire, à la membrane plasmique, et aux sites d'invasion des cellules épithéliales par certaines bactéries.

Par exemple, le collier de septines entre deux cellules en division chez la levure orchestre la cascade de protéines kinases nécessaires pour surmonter le point de contrôle G2 (point de contrôle de morphogénèse<sup>51</sup>). Les septines sont aussi importantes lors de l'abscission, où elles aident la séparation des deux cellules filles. Chez les mammifères, cette séparation se fait par l'ajout de membrane nouvellement synthétisée dans des zones spécifiquement définies. Ce processus est spécifiquement régulé par les SNARES, par le complexe d'exocyste et par les septines. Des défauts dans le fonctionnement des SNARE, protéines associées à la membrane, mènent à des défauts dans la fusion membranaire et à l'accumulation des vésicules. La déplétion de Sept9 et Sept2, septines impliquées dans la division cellulaire, mène à un phénotype semblable, ce qui confirme un rôle des septines dans la régulation de la voie du trafic vésiculaire par les SNARE<sup>52</sup>. Elles interagissent avec le complexe exocyste<sup>53</sup> et Sept5 peut lier directement syntaxin 1 et 2<sup>54</sup>.

Les septines peuvent aussi former des structures d'échafaudage à la membrane plasmique. Sept4 lie spécifiquement les phosphatidylinositol 4,5-biphosphate et phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate<sup>55</sup>. Chez la levure, les septines ont une affinité de liaison plus grande pour les phosphatidylinositol-4-phosphate et phosphatidylinositol-5-phosphate<sup>56</sup>.

Les septines participent dans le processus d'invasion des cellules épithéliales par des bactéries pathogènes<sup>57</sup>. Sep9, Sep2 et Sep11 sont recrutés à la membrane au site d'invasion dans des colliers autour de l'actine<sup>57</sup>. Ce recrutement est dépendant de l'accumulation d'actine au site d'invasion (Mostowy, Janel et al. 2011). InlA interagit avec E-cadhérine et InlB interagit avec le récepteur tyrosine kinase Met. La bactérie *Listeria monocytogenes* utilise la voie de l'InlB pour entrer dans la cellule par une cascade d'événement incluant la polymérisation de l'actine et l'expansion membranaire<sup>58</sup>. Sept2 et Sept11 régulent les niveaux et la distribution des récepteurs

de surface Met et leur déplétion est caractérisée par une diminution de l'élasticité cellulaire et des défauts dans la forme cellulaire<sup>58</sup>. La déplétion de Sep2 par ARNi diminue l'invasion bactérienne, tandis que la déplétion de Sep11 a l'effet contraire<sup>57,59</sup>.

## 1.7.2 Barrière de diffusion

Les septines forment des barrières de diffusion qui servent à définir différents domaines membranaires, qui se différencient par la localisation des protéines spécifiques. Des anneaux de septines sont observés entre deux cellules en division, à la base de l'annulus des spermatozoïdes, à la base des cils et entre les neurones dendritiques. Le collier chez la levure assure la propre ségrégation des protéines entre la mère et le bourgeon, et le maintien de la polarité<sup>60,61</sup>.

Normalement, l'annulus (en forme d'anneaux) assure l'intégrité du spermatozoïde et maintient l'emplacement des différentes protéines tout au long de sa queue. Les septines semblent participer dans l'assemblage de cette structure, car des souris, nulles pour le gène Sept4, ne possèdent pas d'annulus<sup>62</sup>. Ces souris présentent donc des défauts de morphologie, de motilité et sont stériles.

Les cils sont des protrusions cellulaires, enveloppées de membrane, qui possèdent une fonction sensorielle (primaires) ou motile. Un complexe de 9 protéines est formé et maintenu à la base des cils par Sept2<sup>63</sup>. Ce complexe assure la séparation de la membrane cellulaire et la membrane des cils. La déplétion des septines est caractérisée par des défauts de formation et induit une diffusion augmentée<sup>64,65</sup>.

Les neurones dendritiques présentent des réseaux branchés qui assurent la transmission des signaux entre les cellules avoisinantes. La déplétion des septines perturbe cette organisation et cause des défauts de communication entre les dendrites<sup>32,66</sup>.

## 1.8 Dérégulation des septines et pathologies

Les septines sont dérégulées dans plusieurs maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives et les ciliopathies. Les mécanismes par lesquels elles contribuent à ces désordres ne sont pas encore bien élaborés.

### 1.8.1 Le cancer

Il a été démontré que plusieurs septines sont surexprimées dans des tumeurs solides. Étant donné que les septines sont impliquées dans la division cellulaire et se localisent au sillon de clivage, leur dérégulation mène à des défauts de cytokinèse. Sep2 a été démontré comme jouant un rôle dans l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique par son interaction avec CENP-E, impliqué dans la régulation du point de contrôle <sup>67</sup>. Sa dérégulation peut essentiellement mener à la mauvaise distribution des chromosomes et l'aneuploïdie, typique des cellules cancéreuses. À ce jour, les septines ont été démontrées à servir comme partenaires de fusion de certains gènes et agissant en tant qu'oncogènes et suppresseurs de tumeurs selon les cas.

Sept9\_11 spécifiquement a été proposé comme marqueur pour le cancer de la prostate vu que cette septine est exprimée dans les cellules cancéreuses uniquement. Son expression corrèle avec une note de Gleason élevée <sup>68,69</sup>. Un test sanguin Epi *pro*Colon® de dépistage pour le cancer du côlon a été proposé, basé sur le fait que le gène sept9 se retrouve hyperméthylé au niveau des îlots CpG dans les cellules cancéreuses. Ce moyen de détection est avantageux, car il est simple et rapide.

La surexpression de Sep2 a été associée avec une meilleure prolifération des cellules cancéreuses en augmentant l'expression des métalloprotéinases 2 et 9 (MMP-2 et MMP9) de la matrice cellulaire et en inhibant l'activité de clivage des caspases 3,7 et 9. Ceci augmente la capacité invasive des tumeurs et inhibe l'apoptose <sup>70</sup>.

Certaines septines (Sept2, Sept5, Sept6, Sept9, Sept11) peuvent aussi servir comme partenaires de fusion du gène MLL dans les cancers du sang comme la leucémie. Cette fusion survient suite à une translocation des chromosomes au locus 11q23<sup>71</sup>. Elle pourrait potentiellement perturber les interactions entre les septines et donc, la formation des complexes et structures hautement organisées. Par contre, les mécanismes d'action de ces gènes de fusion

dans l'établissement du cancer ne sont pas encore clairs. Les protéines de fusion du gène MLL mènent souvent à l'activation d'un nombre de gènes HOX et d'autres gènes impliqués dans la différenciation cellulaire<sup>72</sup>.

**Tableau I. L'expression et l'implication des septines dans le cancer**<sup>70</sup>

Gene	Oncogenic function	Tumor suppressor function	Tumor type	References
SEPT1	Overexpression		Oral cancer	(Kato et al., 2007)
SEPT2	Overexpression		Brain	(Sakai et al., 2002; Kim et al., 2004; Khalil, 2007; Kumar et al., 2008)
	Gene fusion		AML	(Cerveira et al., 2006; van Binsbergen et al., 2007)
	Overexpression	Downregulation	Kidney Glioma	(Craven et al., 2006a,b) (Khalil, 2007)
SEPT3	Overexpression		Medulloblastoma/ teratocarcinoma	(Methner et al., 2001; Kim et al., 2004)
SEPT4	Overexpression		Prostate cancer, renal cell carcinoma and bladder cancer	(Tanaka et al., 2003)
ARTS	Overexpression	Knockout mice Downregulation	Astrocytoma, leukemia	(Gottfried et al., 2004; Garcia-Fernandez et al., 2010), (Elhasid et al., 2004)
SEPT5	Overexpression Gene fusion		Pancreas AML	(Capurso et al., 2005) (Magonigal et al., 1998; Tatsumi et al., 2001; Santos et al., 2010a)
SEPT6	Gene fusion		AML  Melanoma	(Ono et al., 2002; Kadkol et al., 2006; Cerveira et al., 2008) (Jaeger et al., 2007)
SEPT7		Downregulation	Glioma	(Nagata et al., 2000; Jiang, 2002; Jiang, 2004; Jia et al., 2010; Tanaka et al., 2010)
SEPT8	None	None		None
SEPT9	Amplification/ overexpression Upregulation Gene fusion		Breast  Ovary AML, ALL	(Montagna et al., 2003; Scott et al., 2005; Gonzalez et al., 2007, 2009)  (Strehl et al., 2006; Gulten et al., 2009; Saito et al., 2010) (Santos et al., 2010a,b) (Osaka et al., 1999; Yamamoto et al., 2002; Strehl et al., 2006; Kreuziger et al., 2007)
		Hypermethylation	Colon and head and neck	(He et al., 2010; Tierling et al., 2010; Qyun et al., 2010) (Grutzmann et al., 2008; deVos et al., 2009) (Bennett et al., 2008; Lofton-Day et al., 2008; Stanbery et al., 2010)
		Deletion	Ovary, breast Hodgkin lymphoma	(Kalikin et al., 2000; Russell et al., 2000) (Giefing et al., 2008)
SEPT10	None	None		
SEPT11	Gene fusion	Deletion Deletion	AML Liver	(Santos et al., 2010b; Stevens et al., 2010) (Huang et al., 2010)
SEPT12	None	None		
SEPT13	None	None		
SEPT14	None	None		

## 1.8.2 Maladies neurodégénératives

La dérégulation des septines est aussi liée à certaines maladies neurodégénératives comme le désordre d'Alzheimer et de Parkinson.

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la perte de la fonction neuronale causée par la formation des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires dans le cerveau. Les enchevêtrements neurofibrillaires contiennent des agrégats de la protéine tau phosphorylée. Trois septines humaines (Sept2, Sept1, and Sept4) semblent contribuer à la dégénérescence neuronale dans la maladie d'Alzheimer, en formant des complexes hétéropolymériques qui interagiraient directement ou indirectement avec tau<sup>73</sup>.

Dans la maladie de Parkinson on observe la perte de la fonction de l'ubiquitine ligase E3 Parkin, et l'accumulation des agrégats de ses substrats sous la forme des corps de Lawy. Ces substrats incluent deux septines: Sept4 et Sept5, dont la dérégulation est responsable de la progression de cette maladie. Sept4 forme des agrégats avec  $\alpha$ -synucleïne dans les corps de Lewy, et Sept5 semble jouer un rôle dans la perte des neurones dopaminergiques.

Ensemble, ces découvertes suggèrent un rôle pour les septines au niveau du système neuronal<sup>74</sup>.

## 1.8.3 Ciliopathies et Infertilité

Sept2 forme un anneau à la base des cils qui sert comme barrière de diffusion. Sa dérégulation mène à la localisation défectueuse des protéines de la membrane ciliaire ce qui affecte la ciliogénèse et mène à des ciliopathies<sup>75</sup>.

Sept12 est impliqué dans la formation de l'annulus du sperme en formant un complexe octamère avec Sept7, 6, 2 et 4. Le complexe est assemblé comme suit : 2-7-6-2-2-6-7-12 ou 12-7-6-4-4-6-7-12 et forme des structures filamenteuses à la base de l'annulus. Des mutations dans Sept12 (SEPT12 (T89M) et SEPT12 (D197N)) perturbent la formation de ce complexe et induisent la malformation de l'annulus. Ce problème est caractérisé par une queue de spermatozoïdes pliée et une motilité réduite, ce qui cause l'infertilité chez l'homme<sup>76</sup>.

## 2. Projet de recherche

### 2.1 Problématique et hypothèse

Aujourd'hui, on comprend mieux l'implication des septines dans les différents processus, comme la division cellulaire, les échanges membranaires et le trafic vésiculaire, mais il reste encore à élucider leurs mécanismes d'action précis. On sait qu'elles forment des complexes qui peuvent ensuite polymériser en structures hautement organisées, comme des filaments et des anneaux, mais les dynamiques d'assemblage et de désassemblage de ces structures ne sont pas bien connues. De plus, le cytosquelette de septines et le cytosquelette d'actine semblent être interdépendants, mais les mécanismes, ainsi que les conséquences de ces interactions restent à être éclaircis.

Ici, on utilise la mouche à fruit (la *Drosophile*) comme modèle pour clarifier le mode d'assemblage des septines en structures hautement organisées, et leur lien avec le cytosquelette d'actine. L'hypothèse étant que les septines forment des structures hautement organisées qui servent de réservoir pour la cellule et sont rapidement disponibles lors d'un besoin immédiat. On propose aussi qu'il existe un mécanisme de mobilisation qui passe par le cytosquelette d'actine, car ces structures semblent nécessiter un cytosquelette d'actine fonctionnel.

### 2.2 Procédures expérimentales et objectifs

Pour tester cette hypothèse, nous avons à notre disposition un microscope confocal à disque rotatif qui nous permet de suivre les cellules S2 en temps réel pendant des longues périodes de temps. Le comportement des protéines d'intérêt peut être observé à l'aide des marqueurs fluorescents dans des lignées de cellules stables. La *Drosophile* présente un génome simple avec seulement 5 gènes de septines comparativement aux 13 qu'on retrouve chez l'humain. On y retrouve aussi un petit nombre d'isoformes pour les différents gènes de septines, ce qui facilite énormément leur étude. Un autre outil très puissant est la technique d'ARNi, qui nous permet de diminuer spécifiquement l'expression d'une protéine cible et d'observer l'effet que ceci a sur certains processus cellulaires. Cette approche expérimentale fonctionne très bien chez la

*Drosophila*, car ce système ne présente pas une réponse d'interféron, telle que rencontrée chez les mammifères ce qui permet l'utilisation des longs ARNs double brin très efficaces.

Ce projet a comme objectifs spécifiques de:

**(1) Caractériser les structures de septines hautement organisées en élucidant leur composition, principes d'assemblage et de désassemblage et propriétés dynamiques.**

a) Composition et principes d'assemblage et de désassemblage: nous avons généré une lignée cellulaire exprimant Sep2 pA-GFP, qui se localise aux structures de septines, et des ARNs contre chaque septine (*sep1*, *sep2*, *pnut*, *sep4*, *sep5*). On peut alors observer l'effet de la déplétion des différentes septines sur les structures de septines hautement organisées, et définir les septines qui y participent et sont essentielles pour leur formation.

b) Propriétés dynamiques: nous avons utilisé la technique de **redistribution de fluorescence après photoblanchiment** (Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)) pour déterminer la stabilité et les échanges possibles avec le cytoplasme des structures de septines hautement organisées.

**(2) Déterminer le rôle du cytosquelette d'actine dans l'organisation des structures de septines hautement organisées.**

Nous avons utilisé des drogues qui affectent la dynamique du cytosquelette d'actine: La Latrunculin A (déstabilise la F-actine) et la Jasplakinolide (stabilise la F-actine) pour étudier l'importance d'un cytosquelette d'actine intact. Nous avons utilisé des marqueurs de la F-actine (LifeAct-GFP et phalloïdine) et une lignée cellulaire exprimant l'Actine05C pour étudier la localisation de l'actine aux structures de septines. Nous avons aussi voulu explorer le rôle de la polymérisation de l'actine à l'aide d'un mutant d'actine (G62D), incapable de former des filaments et la déplétion de certains régulateurs d'actine (Cofilin et AIP1).

### 3. Matériels et Méthodes

#### Clonage et Mutagenèse

Des ADNc pour *sep1*, *sep2*, *pnut*, *sep4*, *sep5* et *actin5C* ont été identifiés sur FlyBase et commandés à partir de la librairie du centre de recherche et génomique de la *Drosophila* (Drosophila Genomics Research Center/DGRC). Ils ont ensuite été amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et clonés dans un vecteur de clonage pENTR/D-TOPO Gateway (Invitrogen).

Un mutant non polymérisable de l'actine (R62D) a été généré en utilisant le kit Q5 de mutagenèse dirigée de New England BioLabs (NEB). Les amorces ont été construites en se basant sur le site NEBaseChanger™ et ont été utilisées avec les températures d'hybridation suggérées.

**Tableau II. Les amorces utilisées pour la construction des lignées cellulaires**

<i>sep1</i>	Amorce F	caccATGGCCGATACAAAGGGCTT
	Amorce R	CTGCTGGGCCTGCATGCGCG
<i>sep2 PA</i>	Amorce F	caccATGTCCGTTGAGGTGGA
	Amorce R	CTTCTTCTTGCTCTTGCCGAGG
<i>sep2 PB</i>	Amorce F	caccATGGACACGCTGTTCAACAC
	Amorce R	CCTCGGCAAGAGCAAGAAGAAG
	Amorce F	caccATGAATAGTCCTCG

<i>pnut</i>	Amorce R	GAAAAAGAAGGGTCTGTTCT
<i>sep4 PG</i>	Amorce F	caccATGTCTAAAACGCCGTCG
	Amorce R	GACGTCGATCACGCTGTCA
<i>sep5</i>	Amorce F	caccATGGTTCATTTAGTGA
	Amorce R	CTTTTCTTGCCCCTGCCCAA
<i>actine05C</i>	Amorce F	caccATGTGTGACGAAGAAGTTGC
	Amorce R	GAAGCACTTGCGGTGCACAA
<i>actin5C_R62D</i>	Amorce L	caccGCAGAGCAAGGACGGTATC
	Amorce R	GCCTCATCACCCACGTAC
<i>cofiline</i>	Amorce L	caccATGGCTTCTGGTGTA
	Amorce R	TTGGCGGTCGGTGGCCCGGAG
<i>orc6</i>	Amorce L	caccATGACTACCTTAATAGAACA
	Amorce R	GATAGCCAGCTTCTCGAGGCT
<i>hillarin</i>	Amorce L	caccATGTATCGGCCAAATTTCTA

	Amorce R	ATCAACTCGTCCAAGCGGAAT
--	----------	-----------------------

## Les ARN interférants (ARNis)

- Les amorces contre les gènes cibles ont été commandées de Invitrogen, en utilisant celles de la librairie du laboratoire Vale comme modèle, pour générer des ARNi contre Sep1, Sep2, Pnut, Sep4, Sep5, Actin et Cofilin.
- Les ARNs ont été générés par transcription *in vitro* suite à deux PCR consécutives<sup>78</sup>. La première réaction de PCR est faite en utilisant les amorces dans le tableau III, précédées par une séquence d'ancrage riche en GC (5'-GGGCGGGT) et sert à amplifier spécifiquement la séquence de chaque gène à partir des ADNc ou à partir de l'ADN génomique. Le deuxième PCR se fait avec des amorces T7 universelles du promoteur de la polymérase ARN T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGGGCGGGT) suivies par la même séquence d'ancre riche en GC (5'-GGGCGGGT).
- La réaction de transcription *in vitro* se fait durant la nuit, selon le protocole du kit RiboMax™ Large Scale RNA Production System-T7 de Promega.
- La taille et la concentration des ARN produits ont été vérifiées sur gel d'agarose 1%.
- Les cellules S2 ont été cultivées à 37°C, dans un milieu complet de Schneider, et elles ont été traitées avec de l'ARNis à une concentration de 2,5 µl par ml. L'efficacité des différents ARNis a été mesurée par imagerie ou par immunobuvardage de type Western.

**Tableau III. Les amorces utilisées pour la construction des différents ARNis**

Sep1	Amorce L	gggcgggtATCTTTTATATACGCGCTTGGC
	Amorce R	gggcgggtTAAGCGAGTAGCCTGCTAAACC
Sep2	Amorce L	gggcgggtACAAGGACGACTCGTTCAAGG

	Amorce R	gggcgggtAACATCTGACGAACCTCCTCC
Pnut	Amorce L	gggcgggtATCAACTCCATGTTCTGTCG
	Amorce R	gggcgggtCAGCGGTAGTTCTCGTAGTGG
Sep4	Amorce L	gggcgggtGGGATCTGTCTATGTCTTTCCG
	Amorce R	gggcgggtCTGATTAAGACAACGACTCTCCC
Sep5	Amorce L	gggcgggtCCTTTACAACTCCGTACTGCC
	Amorce R	gggcgggtTCAGGTTAATAAAGCGGACAGC
Cofilin	Amorce L	gggcgggtATGTTGTACTCCAGCTCCTTCG
	Amorce R	gggcgggtACAGGATACGTGTTTCCATCG
AIP1	Amorce L	gggcgggtTTCAAGTTCAAGATGACCAAGC
	Ammorce R	gggcgggtTTCACCACATAGTCCGTGTAGG
Cappucino	Amorce L	gggcgggtCGTAAGGATGATGGAGAAGACC
	Ammorce R	gggcgggtATATTGGACACGGATAGTGACG
Spire	Amorce L	gggcgggtACAGTTATAAACAACGGCATCG
	Ammorce R	gggcgggtACAGTTATAAACAACGGCATCG

Daam	Amorce L	gggcgggtATCTGGAAACATATACACCGGG
	Ammorce R	gggcgggtACAAGGACATTCAGATGCTGC
LacI (contrôle négatif)	Amorce L	gggcgggtGGTGGTGTTCGATGGTAGAA
	Ammorce R	gggcgggtCGGTATCGTCGTATCCCACT
Pbl (contrôle positif)	Amorce L	gggcgggtTCAGCATATGGTGGATGTAC
	Ammorce R	gggcgggtGAACGCCGCTTGCACAGCTCA
Hillarín	Amorce L	gggcgggtGAGAGTCCTGGAACCTGACACC
	Ammorce R	gggcgggtAAGAAGAAGGAGAGCATCACCC
Actine 5C	Amorce L	gggcgggtGCATGGAAGT
	Ammorce R	gggcgggtGTGCTTCTAA
Actine 42A	Amorce L	gggcgggtGGATCTCCAA
	Ammorce R	gggcgggtGCTGGAACCA

## **Culture cellulaire**

Les cellules ont été passées dans des plaques de 24, 12 ou 6 puits dans du milieu de Schneider supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (Invitrogen) et de la pénicilline/streptomycine chaque semaine pour maintenir une bonne croissance.

## **Transfections et lignées cellulaires**

Toutes les lignées cellulaires utilisées ont été produites par transfection et sélection pour produire des lignées stables. Les cellules S2 de *Drosophila* ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits (Falcon) une journée avant la transfection dans un milieu complet de Schneider 1X (Gibco) à une confluence d'environ 80%. Les plasmides d'intérêt, le plasmide de résistance pCoHygro (Invitrogen) et le réactif Cellfectin II (Invitrogen) ont été incubés séparément, mais en parallèle dans du milieu Schneider 1X (Gibco) sans sérum pour une durée de 15-30 min. Les deux mélanges sont ensuite combinés dans un ratio de 1 :8 (Cellfectin II/ADN) et incubés pour une durée de 30 min. Entre-temps, le milieu des cellules a été changé pour du milieu sans sérum qui est ensuite remplacé par le milieu de transfection, incubé pendant 3-4 heures avant d'être remplacé par du milieu complet. La sélection commence 48 heures post-transfection et se fait dans du milieu avec de l'hygromicine B (50mg/ml) pendant 1 mois. Après ce mois les cellules sont mises en culture dans du milieu Schneider 1X (Gibco) et sont passées chaque semaine. Ce milieu contient du FBS, de la Penicilline et de la Streptomycine dans un ratio de 1 :10.

## **L'immunobuvardage de type Western**

Les cellules S2 sont cultivées dans des plaques de 96 puits en présence d'ARNi pendant 4 jours et sont ensuite lysées dans du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, et 1% Triton X-100 complété avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche : Complete, protease inhibitor cocktail tablets)). Des quantités de protéines égales dissoutes dans un tampon Laemmli (20% glycérol, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,125 M Tris-HCl, 0,05% bleu de

bromophénol) et dénaturées pendant 5 min à 90°C ont été chargées sur gel SDS-PAGE (8%) à partir des lysats de cellules obtenus suite à une quantification de protéines Bradford (Biorad). Les protéines sur gel ont été transférées (1 heure ou sur la nuit à 0,06 A) sur une membrane de nitrocellulose Amersham Hybond ECL (GE Healthcare) bloquée avec 5% de lait (Carnation, Lait écrémé en poudre instantané) dans du TBST (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20). La membrane a été incubée avec un anticorps primaire contre Pnut (1:1000 surnageant concentré du clone 4C9H4; Developmental Studies Hybridoma Bank; Neufeld and Rubin, 1994) dilué dans du TBST-1% lait pendant 3 heures à température pièce ou durant la nuit à 4°C. Les membranes sont alors lavées plusieurs fois avec du TBST pendant une période de 30 min, et sont incubées avec des anticorps secondaires contre souris extraits d'âne couplés à la peroxydase (1:5000; GE Healthcare) pour 1 heure à température pièce, et lavées encore avec du TBST pendant 30 min avant détection avec le substrat ECL (Clarity; Bio-Rad Laboratories). Finalement la révélation a été faite sur des films (Fujifilm, Super RX) avec des temps d'exposition variables. Un anticorps contre la tubuline a été utilisé pour les contrôles (clone DM1A; 1:1,000; Sigma-Aldrich).

## Microscopie

L'imagerie en temps réel a été faite à température pièce en utilisant un microscope inversé (DMI6000 B; Leica) avec un système confocal à disque rotatif (Ultra-VIEW Vox; PerkinElmer), équipé d'une plateforme piézoélectrique motorisée (Applied Scientific Instrumentation), une caméra (ORCA-R2; Hamamatsu Photonics) et une unité de balayage (CSU-X1; Yokogawa Corporation of America). Le logiciel Volocity (version 6; PerkinElmer) a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données. Les images ont été captées avec un objectif Plan Apo 40x (0.85 NA; Plan Achromat) ou un objectif Plan Apo 63x submergé dans l'huile (1.4 NA; Plan Achromat) avec un binning réglé à 2X2 ou 1X1. Les cellules cultivées dans des plaques de 96 puits (expériences ARN) ont été transférées dans des plaques de 96 puits (Whatman) ou 8 puits en verre (Labtek, Nunc) au moins 30 min avant l'imagerie.

L'expression sous le promoteur de metallothionein a été induite 12-24h avant l'imagerie des cellules au microscope à l'aide du CuSO<sub>4</sub> à une concentration de 250 µM.

Le traitement avec la Latrunculin A (Calbiochem) ou la Jasplakinolide (Calbiochem), a été fait pendant l'acquisition en ajoutant un volume de 10 µl pour arriver à une concentration finale de 10 µg/ml et 10 µg/ml respectivement.

L'imagerie de fluorescence par réflexion interne totale (TIRF) a été faite lors de l'achat des microscopes pour le centre de recherche de Sainte Justine par Gilles Hickson. Les cellules ont été fixées sur des lamelles traitées avec de la Concanavalin A et les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope inversé des Microsystèmes de Leica équipé d'un objectif TIRF 100x 1.49NA à immersion dans l'huile dans la base d'essai des Microsystèmes de Leica, Wetzlar, Germany.

## **Immunofluorescence**

Les cellules S2 ont été fixées dans des plaques de 96 puits avec un fond en verre (Whatman) dans du PBS avec 4% formaldéhyde et 0.1% glutaraldéhyde pendant 10 min. Du PBS avec 0.1% Triton X-100 (PTX buffer) et 5% sérum de chèvre normal <sup>79</sup> a été utilisé pour perméabiliser les cellules et pour bloquer pendant une heure avant l'incubation avec les anticorps primaires qui a été faite sur la nuit à 4°C (mAb 4C9H4 contre Pnut concentré, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:100, Sep1, <sup>34</sup>). Les cellules ont été lavées avec PTX /5%NGS sur une période de 30 min et incubées avec les anticorps secondaires (anticorps de chèvre contre souri Alexa Fluor 488-, Alexa Fluor 546-, or Alexa Fluor 647-conjugués; 1:500; Molecular Probes/Invitrogen). Elles ont ensuite été lavées 2 autres fois et conservées dans du Fluoromount-G (SouthernBio- tech). Les images ont été prises comme décrit plus haut dans la section Microscopie.

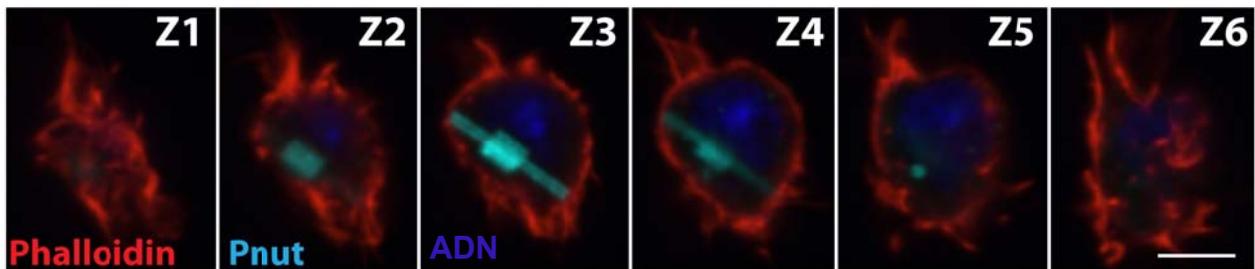
## **Récupération de fluorescence après photo-blanchissement**

Les expériences de FRAP ont été réalisées en utilisant le module de PhotoKinesis (PerkinElmer) et le logiciel Volocity. Seulement un plan dans l'axe des  $Z$  a été pris avec un objectif Plan Apo 63x. Une image a été prise pré-blanchissement, suivi du photo-blanchissement d'une région définie. Par la suite, une acquisition à vitesse maximale pendant 30 secondes a été faite suivie de l'acquisition à chaque 5 min pour 16 heures. Les données ont été exportées de Volocity et analysées dans Microsoft Excel avec correction pour le bruit de fond et le photo-blanchissement. Des graphiques de récupération ont été tracés pour chaque structure de septine, qui a servi à calculer le pourcentage de récupération dans le temps. Les expériences ont été faites en triplicata.

## 4. Résultats

Nous nous sommes intéressés à la localisation de la protéine Pnut dans la cellule et un marquage avec un anticorps contre Pnut nous permet de voir sa localisation au sillon de clivage pendant la cytokinèse, mais aussi sa localisation dans des structures massives de hautes intensités.

Ces structures varient en tailles et en nombre par cellule. Différentes cellules en possèdent une, plusieurs ou même peuvent se retrouver sans structure, tel qu'illustré à la Figure 5, A et B. Elles sont cytoplasmiques, tel qu'illustré à la Figure 9, et suite à une quantification, sont présentes dans environ 30% des cellules en interphase, tel qu'illustré à la Figure 10.



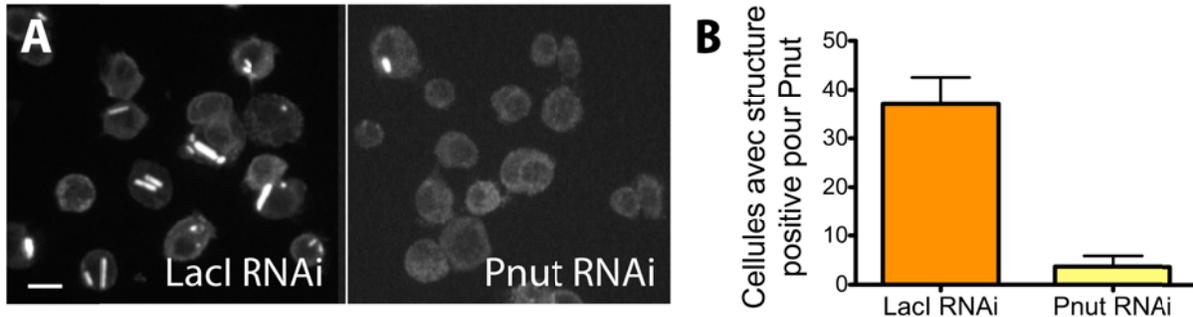
**Figure 9. Les structures de septines sont cytoplasmiques**

Six sections confocales dans l'axe des Z d'une épaisseur de 0.7  $\mu\text{m}$  d'une cellule S2 non-transfectée, fixée au formaldéhyde et marquée avec de la phalloïdine, de l'hoechst et un anticorps contre Pnut (cyan); objectif 63X, échelle 5  $\mu\text{m}$ .

### 4.1 Pnut est essentiel pour les structures de septines

Pour mieux comprendre le rôle spécifique de la protéine Pnut dans l'organisation des structures observées, nous avons traité des cellules S2 avec un ARNi contre Pnut pour 4 jours, ce qui a diminué amplement le pourcentage de structures de septines présentes. Ce pourcentage était de 37% dans le contrôle et de 4% après traitement avec l'ARNi contre Pnut. La déplétion de cette septine déstabilise les structures de septines décrites plus haut. Ceci concorde avec le fait

que les septines forment des complexes et la perturbation d'une composante affecte la stabilité du complexe en entier. On peut conclure que ces structures ne sont pas des artéfacts de marquage, car elles sont présentes dans des cellules S2 non transfectées et disparaissent après la déplétion spécifique de la septine Pnut par ARNi.



**Figure 10. La déplétion de Pnut déstabilise les structures de septines observées**

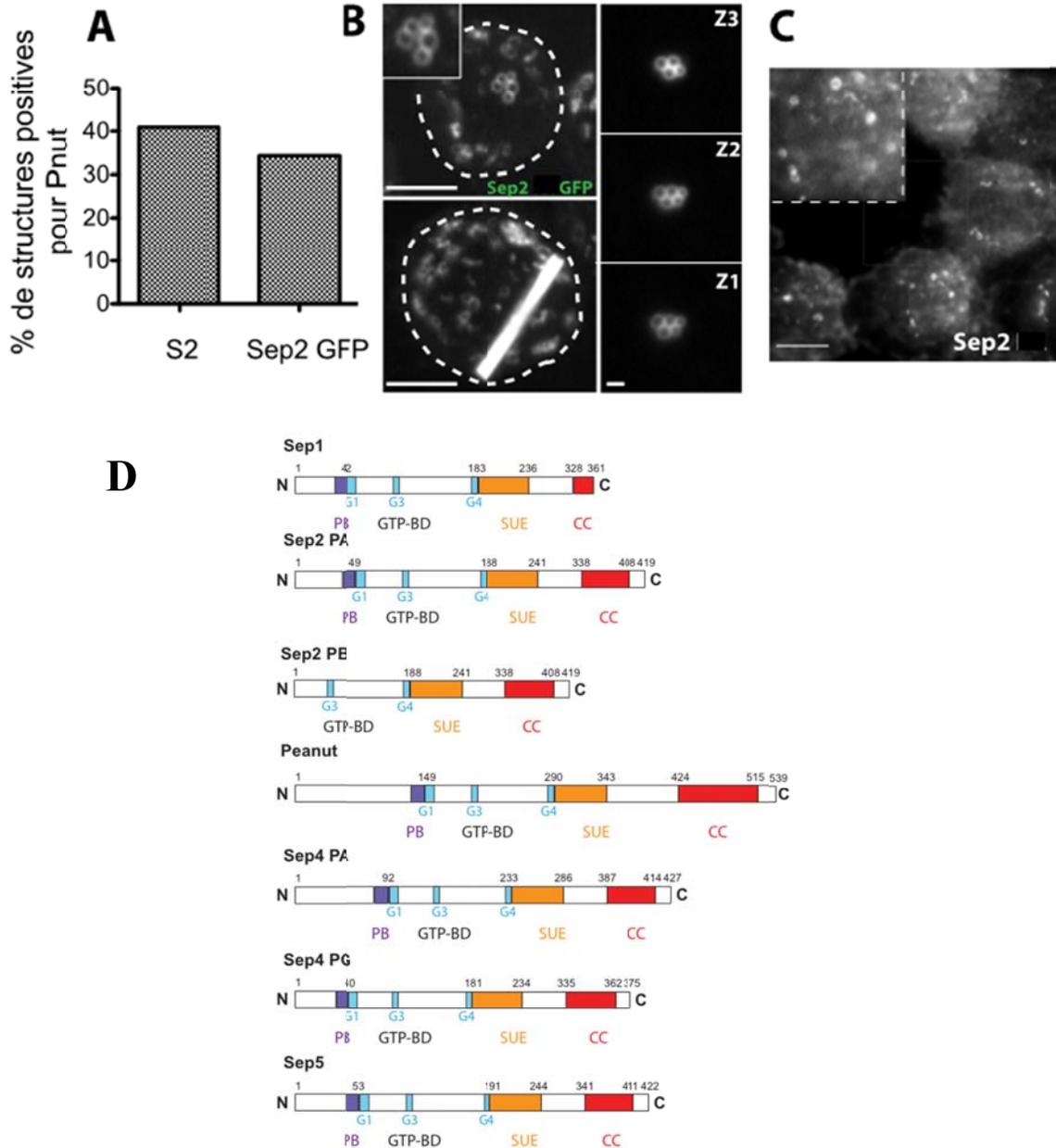
(A) Des cellules S2 non transfectées traitées avec un ARNi contre LaclI (contrôle) ou Pnut pour 4 jours ont été marquées avec de la phalloïdine, de l'hoechst et un anticorps contre Pnut (cyan); objectif 40x, échelle 10  $\mu$ m (B) Quantification du pourcentage de cellules avec structure positive pour Pnut dans le contrôle et suite au traitement avec Pnut ARNi.

## 4.2 Les septines forment des anneaux et des tubes cytoplasmiques

Pour mieux comprendre l'organisation des septines et comment elles forment de telles structures, nous avons couplé Sep2 au GFP pour observer sa distribution dans la cellule. Sep2-GFP (isoforme PA) se localise aux structures observées avec un anticorps contre Pnut. La surexpression de Sep2-GFP n'a pas changé significativement le pourcentage de cellules qui contenaient une telle structure positive pour Pnut, tel qu'illustré à la Figure 11, A. On peut alors utiliser cette lignée pour l'étude des structures de septines et. La microscopie confocale en temps réel démontre que ces structures représentent des tubes, creux à l'intérieur. Des sections optiques, à différentes positions Z, d'une structure de septines orientée dans le plan de l'imagerie,

démontrent que ces structures sont composées d'un nombre variable de tubes qui interagissent latéralement, tel qu'illustré à la Figure 11, B.

Des lignées cellulaires exprimant les autres septines (Sep1-GFP, Sep2 PA-GFP, Pnut-GFP, Sep4 PA/PG-GFP et Sep5-GFP) ont aussi été générées, par contre la surexpression de la protéine Pnut donne une lignée qui présente beaucoup de structures et d'agrégats dans la cellule ce qui rend l'étude des tubes de septine plus difficile; la lignée Sep4 PA-GFP ne présente pas de tubes de septine et l'étude de l'autre isoforme n'a pas été poursuivie; la ligné Sep5-GFP est décrite plus bas et la lignée Sep1-GFP aurait pu être utilisée à la place de la lignée Sep2-GFP, mais celle-ci était produite en premier.

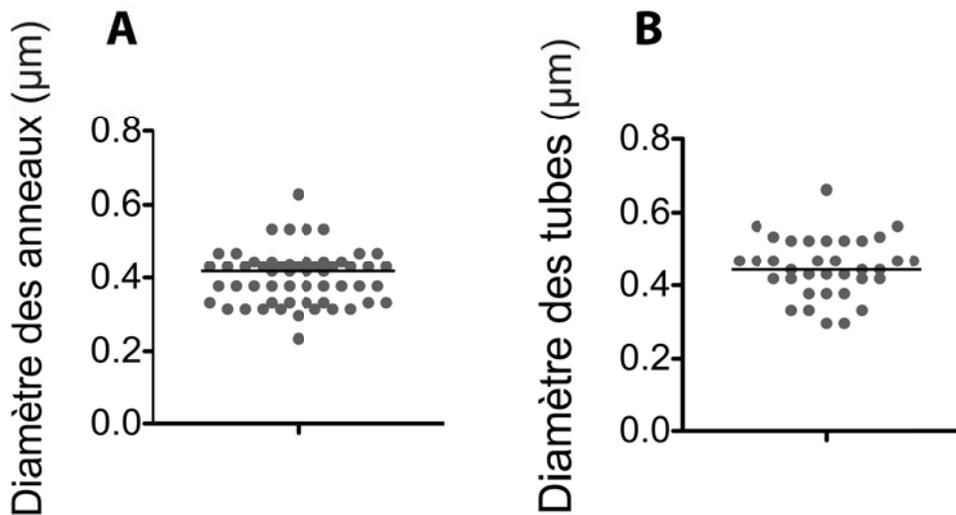


## Figure 11. Les septines forment des anneaux et des tubes cytoplasmiques dans les cellules S2 de *Drosophila*

Des cellules S2 exprimant Sep2-GFP (A) Quantification du pourcentage de structures positives pour Pnut dans des cellules S2 non transfectées et des cellules S2 exprimant Sep2 PA- GFP (N= 368 (S2); N=309 (Sep2-GFP), n=1) (B) Anneaux et tubes cytoplasmiques et trois sections

confocales d'une coupe latérale d'un tube; objectif 63X, échelle 5  $\mu\text{m}$  (gauche) et 1  $\mu\text{m}$  (droite)  
(C) Microscopie à fluorescence par réflexion totale interne (TIRF); échelle 5  $\mu\text{m}$ . (D) Structure primaire des septines et leurs isoformes chez la *Drosophila*

Il est intéressant de noter que Sep2-GFP se localise aussi dans des anneaux cytoplasmiques. Ces anneaux sont présents dans 100% des cellules et semblent aussi se localiser dans l'espace immédiat à proximité de la membrane plasmique comme observé par microscopie à fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) comme illustré à la Figure 11 C. Cette technique de microscopie nous a permis d'exciter la Sep2-GFP uniquement à la surface cellulaire à une profondeur maximale de 100 nm de la lamelle. Ces anneaux et tubes avaient des diamètres semblables de 0.40  $\mu\text{m}$  et 0.45  $\mu\text{m}$ , respectivement, mesurés à l'aide du logiciel Volocity, tel qu'illustré à la Figure 12 (fonction "measure line"). Alors nous concluons que les septines forment des tubes et des anneaux dans des cellules S2 et que Pnut et Sep2 se localisent dans ces structures, tel qu'illustré à la Figure 11, B.

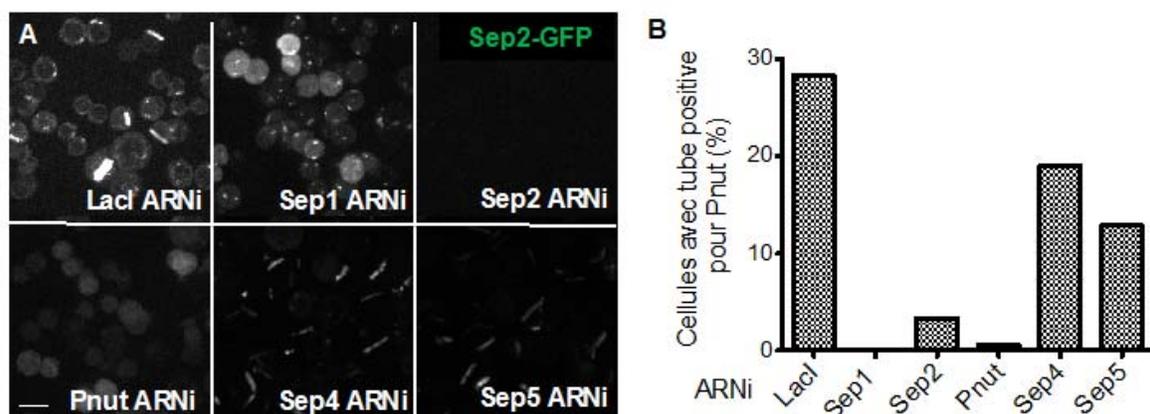


**Figure 12. Les tubes et les anneaux de septines présentent des diamètres similaires**

(A) Le diamètre des anneaux cytoplasmiques est de 0.40  $\mu\text{m}$  (N=56, n=3) (B) Le diamètre des tubes cytoplasmiques est de 0.45  $\mu\text{m}$  (N=35, n=3)

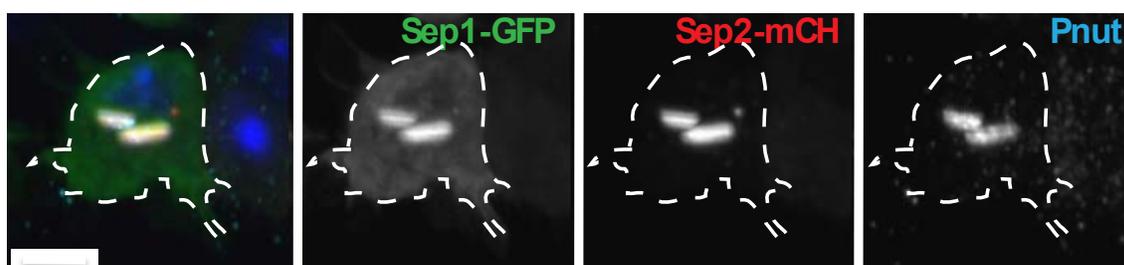
### 4.3 Sep1, Sep2 et Pnut sont essentiels pour la formation des tubes de septines

Étant donné que Pnut et Sep2 se localisent aux anneaux et aux tubes de septines, nous nous sommes demandé si elles sont nécessaires pour la formation et le maintien de ces structures. Des ARNdb contre Sep2 et contre Pnut ont été générés, mais aussi contre toutes les autres septines Sep1, Sep4 et Sep5. La lignée cellulaire décrite dans la section précédente exprimant Sep2-GFP a été traitée avec des ARNdb contre les différentes septines. La déplétion de Sep2 a aboli complètement le signal Sep2-GFP, ce qui confirme l'efficacité de cet ARNdb, tel qu'illustré à la Figure 13, A. La déplétion de Sep1 mène à la formation des flocons de Sep2-GFP désorganisés dans le cytoplasme, ce qui suggère un rôle pour Sep1 dans l'organisation des anneaux et des tubes, tel qu'illustré à la Figure 13. La déplétion de Pnut perturbe aussi ces structures et mène à la répartition uniforme du signal GFP à travers la cellule, comme montré plus haut, Figure 13. Par contre, les ARNdb contre Sep4 et Sep5 n'ont pas eu d'effet détectable sur les anneaux et les tubes de Sep2-GFP. Ces données indiquent que Sep1 et Pnut sont essentiels pour la formation et le maintien des tubes et des anneaux de Sep2-GFP. Pour tester si Sep2 joue un rôle dans l'organisation de ces structures, le nombre de structures positives pour Pnut après la déplétion de Sep2 (et les autres septines) a été quantifié. Les cellules traitées avec ARNi ont été fixées au formaldéhyde et marquées avec un anticorps contre Pnut. La déplétion de Sep1, Sep2 et Pnut ont causé une diminution significative du nombre de structures positives pour Pnut, tandis que la déplétion de Sep4 et Sep5 a eu un effet moindre. Nous concluons que Sep1, Sep2 et Pnut sont essentiels pour l'organisation des anneaux et des tubes de septines dans les cellules S2 de *Drosophila*. Ceci concorde avec la purification du complexe Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut à partir des embryons de *Drosophila*<sup>20</sup>. Une colocalisation de ces trois septines a également été observée aux tubes, dans des cellules S2 exprimant Sep2-mCH et Sep1-GFP, fixées au formaldéhyde et marquées avec un anticorps contre Pnut, tel qu'illustré à la Figure 14.



### Figure 13. Effet de la déplétion des différentes septines sur les anneaux et tubes

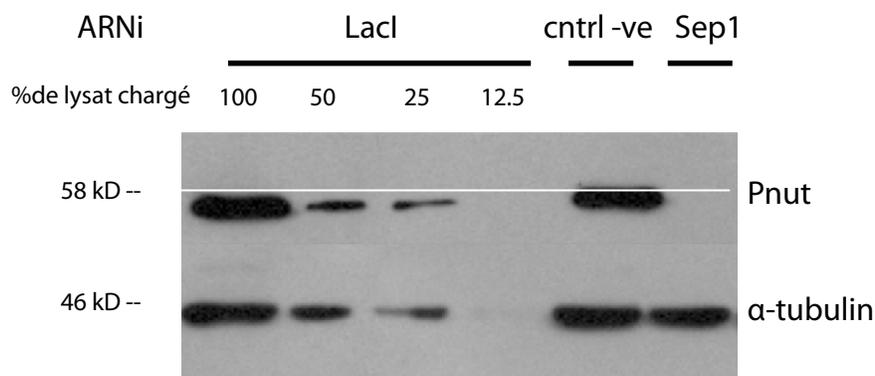
(A) Cellules S2 exprimant Sep2-GFP traitées avec ARNi contre LacI (contrôle) et des ARNi contre Sep1, Sep2, Pnut, Sep4 et Sep5 pour 4,5 jours; objectif 40x; échelle 10  $\mu$ m (B) Quantification du pourcentage de cellules avec tubes positifs pour Pnut dans les cellules S2 traitées avec des ARNi contre LacI (contrôle), Sep1, Sep2, Pnut, Sep4 et Sep5 pour 4,5 jours, fixées au formaldéhyde et marquées avec un anticorps contre Pnut (N= 308 (LacI); N= 112 (Sep1); N= 212 (Sep2 PA); N= 183 (Pnut); N=77 (Sep4); N=142 (Sep5), n=1).



### Figure 14. Sep1, Sep2 et Pnut colocalisent aux tubes de septines

Une cellule S2 exprimant Sep1-GFP et Sep2-mCH fixée au formaldéhyde et marquée avec de l'hoechst et un anticorps contre Pnut; objectif 63x, échelle 5  $\mu$ m.

En parallèle, des immunobuvardages de type Western semi-quantitatifs ont été réalisés pour quantifier les niveaux d'expression de Pnut, suite au traitement des cellules S2 avec un ARNi contre Sep1. Nous avons constaté que la déplétion de Sep1, qui participe dans le complexe de septines, isolé par Field en 1996, mène à la diminution des niveaux d'expression de Pnut (inférieur à 25%). On peut alors penser que les septines agissent seulement en complexe et la perturbation d'une composante mène à la déstabilisation de ce complexe chez la *Drosophile*.

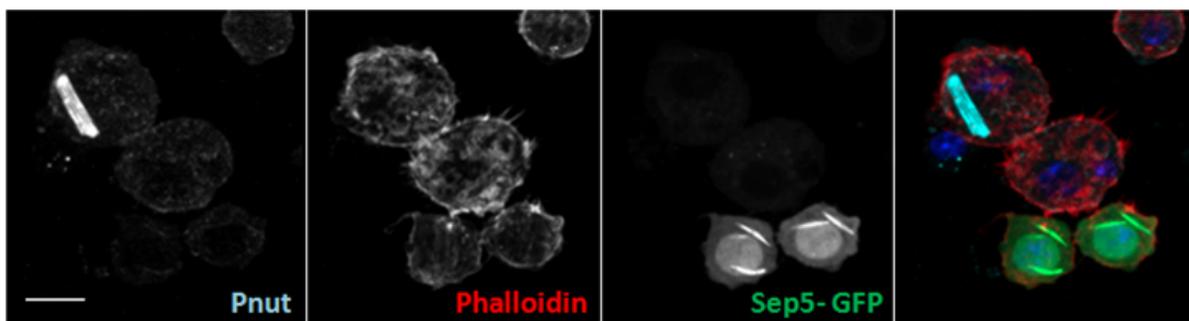


**Figure 15. La déplétion de Sep1 diminue les niveaux d'expression de Pnut à moins de 25 %**

Immunobuvardage de type western des lysats de cellules S2 de *Drosophile* traitées avec des ARNi contre LacI (contrôle) et Sep1 pour 4 jours. Une dilution en série des lysats de cellules traitées avec LacI (contrôle) a été chargée pour démontrer le seuil de détection et la quantification de la protéine d'intérêt. Les quantités de Pnut ont été détectées avec un anticorps contre Pnut (dilution 1 :1000) et cette même membrane de l'immunobuvardage de type Western a été coupée et incubée avec un anticorps contre la tubuline utilisée comme contrôle de chargement (dilution 1 :1000).

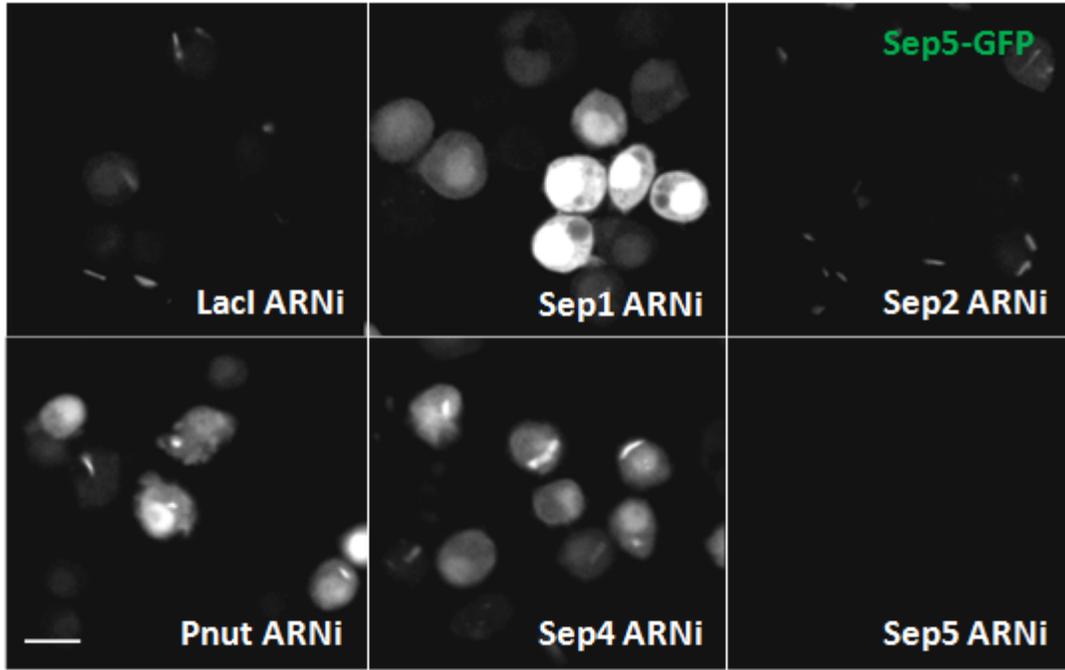
## 4.4 Il peut y avoir de l'hétérogénéité dans la formation des complexes de septines

La littérature suggère que les septines d'un même groupe peuvent être interchangeables dans le complexe formé. Alors plusieurs complexes pourraient potentiellement exister qui seraient définis par les différents niveaux d'expression des septines selon les tissus en question. Chez la *Drosophile* le gène Sep5 est le rétro-gène de Sep2<sup>80</sup>. Ici, on observe que Sep5 semble aussi participer à la formation des structures de septines hautement organisées. Par contre, les structures formées par Sep5 présentent une apparence légèrement différente des tubes observés avec Sep1, Sep2 et Pnut. Les structures marquées par Sep5 sont plus étanches et peuvent être courbées. Ces structures ressemblent plutôt à des filaments, tel qu'illustré à la Figure 16. Pnut peut parfois se localiser dans ces filaments ou pas, tel qu'illustré à la Figure 16. Pour investiguer la composition de ces filaments, on a traité la lignée exprimant Sep5-GFP avec des ARNi contre les différentes septines comme montré pour la lignée exprimant Sep2-GFP. Le traitement avec ARNi contre Sep1 démontre le plus fort phénotype où pratiquement tous les filaments sont déstabilisés (le signal GFP n'augmente pas véritablement). L'ARNi contre Pnut déstabilise aussi ces filaments. On peut alors penser que des structures composées de Sep1, Sep5 et Pnut pourraient coexister avec les structures composées de Sep1, Sep2 et Pnut chez la *Drosophile*.



**Figure 16. Sep5 se localise dans des filaments de septines**

Des cellules S2 exprimant Sep5-GFP fixées au formaldéhyde et marquées avec de l'hoechst, de la phalloïdine et un anticorps contre Pnut; objectif 63x, échelle 5µm.



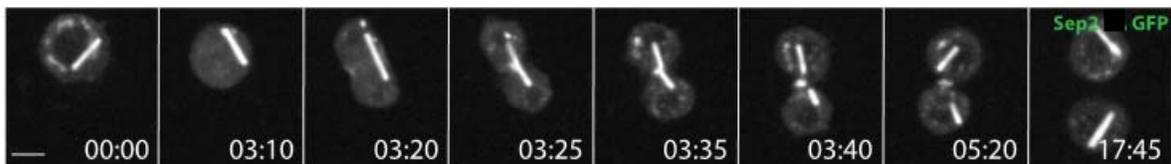
**Figure 17. Effet de la déplétion des différentes septines sur les filaments**

(A) Cellules S2 exprimant Sep5-GFP traitées avec un ARNi contre LacI (contrôle) et des ARNi contre Sep1, Sep2, Pnut, Sep4 et Sep5 pour 4,5 jours; objectif 40x, échelle 10 µm.

## **4.5 Les tubes de septines ne sont pas régulés par le cycle cellulaire, mais les anneaux disparaissent pendant la mitose**

Vu que les septines jouent un rôle comme protéines d'échafaudage pendant la cytokinèse et se localisent au sillon de clivage, on s'est intéressé aux comportements des anneaux et des tubes pendant la division cellulaire. En suivant ces structures pendant un cycle cellulaire au complet (environ 24 heures), il semble que les tubes ne sont pas spécifiquement régulés par le

cycle cellulaire, car ils persistent pendant tout ce temps. Pendant la division cellulaire, les tubes sont hérités, soit entièrement par une des cellules filles d'une manière qui semble aléatoire, ou dans certain cas, ils se retrouvent à l'équateur où le sillon de clivage les coupe en deux et chaque cellule fille en hérite une moitié, tel qu'illustré à la Figure 18. Comme prévu, Sep2-GFP se localisait également au sillon de clivage et au corps central précoce, tel qu'illustré à la Figure 18. Dans les cas où on retrouve plusieurs tubes par cellule, les tubes ont été soit partagés entre les deux cellules filles, soit hérités en entier par une d'entre elles. Par contre, les anneaux cytoplasmiques sont disparus au moment de l'entrée en mitose pour revenir lors de la formation de l'anneau du corps central en télophase. Il n'est pas clair pourquoi les anneaux disparaissent et si ceci a un lien avec le recrutement des septines au sillon de clivage lors de la cytokinèse, tel qu'illustré à la Figure 18.



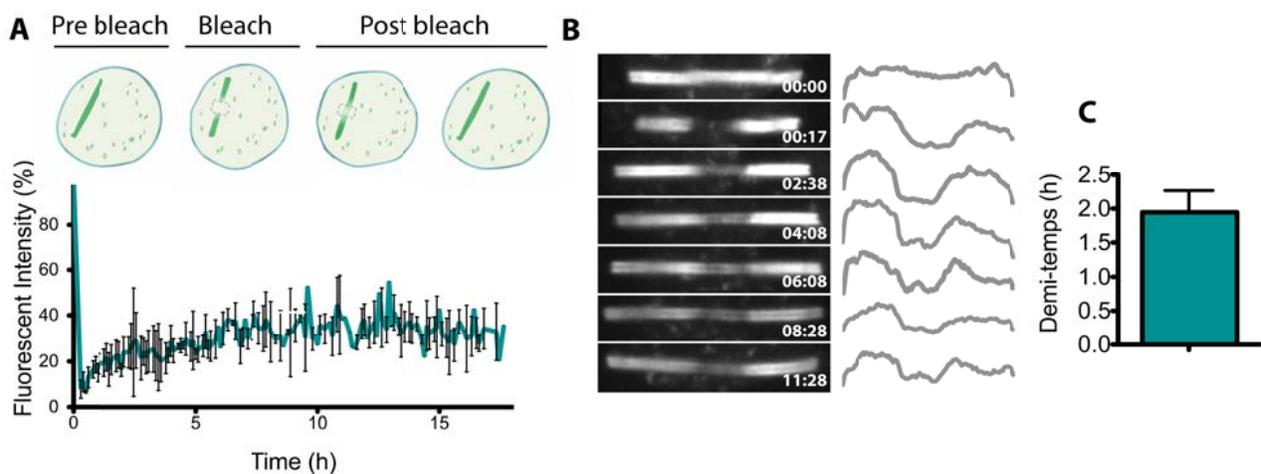
**Figure 18. Les tubes de septines persistent pendant la division cellulaire, tandis que les anneaux disparaissent**

Cellule S2 exprimant Sep2-GFP suivi pendant un cycle de division; objectif 63X, échelle 5 $\mu$ m, temps en min: sec.

## 4.6 Les tubes de septines sont stables

Vu que ces tubes persistent dans la cellule pendant des longues périodes et ne semblent pas être régulés par le cycle cellulaire, on s'est intéressé à leur stabilité. Pour évaluer leur stabilité, nous avons utilisé la technique de récupération de fluorescence après photoblanchissement<sup>81</sup>. Une région, définie à l'aide du logiciel, est illuminée avec un pulse de laser de forte intensité (488 nm) pendant l'acquisition des images, jusqu'à l'ablation du signal. La cellule est suivie dans le temps pour observer et quantifier le retour du signal. Plus le signal revient vite,

plus l'échange avec le cytoplasme se fait rapidement et plus la structure est dynamique. Dans le cas de Sep2-GFP, qui se localise aux tubes, le signal est revenu très lentement avec un retour maximal de 40 % sur 18 heures et une demi-vie de 2 heures, tel que démontré par la Figure 19. Les tubes de septines sont donc très stables au centre et montrent un échange très lent avec le cytoplasme. La même expérience devrait être répétée aux extrémités des tubes de septines pour voir si le taux d'échange varie selon la région choisie (à l'extrémité d'une structure ou au centre d'une structure).



### Figure 19. Les tubes de septines sont stables sur des longues périodes de temps

Cellules S2 exprimant Sep2-GFP (A) Graphique montrant retour moyen du signal GFP suite au FRAP de 8 tubes de septines de 3 expériences différentes (n=3) (B) Kymographe montrant le retour du signal GFP dans le temps (en h:min) pour un tube de septines (C) Demi temps de retour du signal des tubes Sep2-GFP.

## 4.7 Un cytosquelette d'actine dynamique est nécessaire pour le maintien des tubes

Les Septines ont été associées au cytosquelette d'actine chez les mammifères et la *Drosophila*<sup>34</sup>. Pour tester si cela était aussi le cas dans notre système les effets des drogues qui stabilisent (Jasplakinolode) et déstabilisent (Latrunculin A) le cytosquelette d'actine ont été évalués. Différentes concentrations de ces drogues ont été testées sur les cellules S2 exprimant Sep2-GFP jusqu'à ce qu'un effet a été observé tout en s'assurant que les cellules étaient viables.

### **4.7.1 La Jasplakinolide**

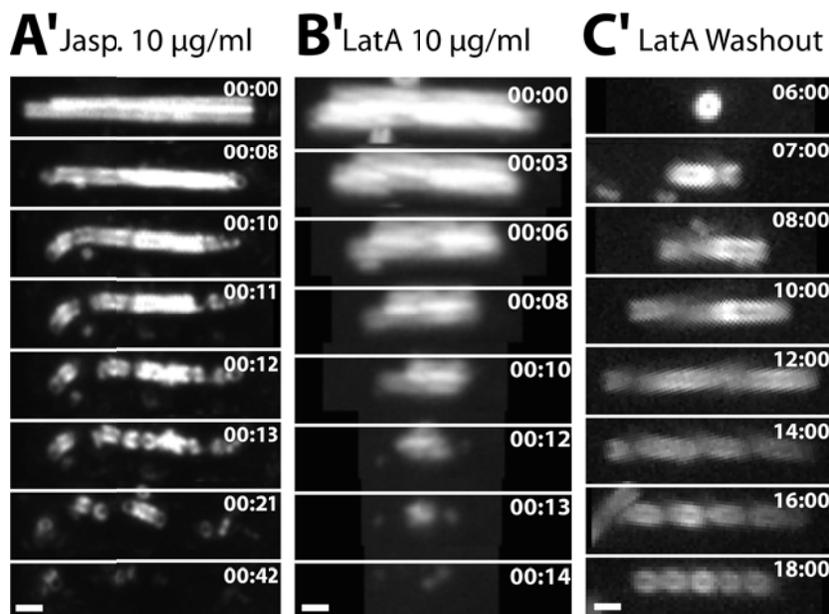
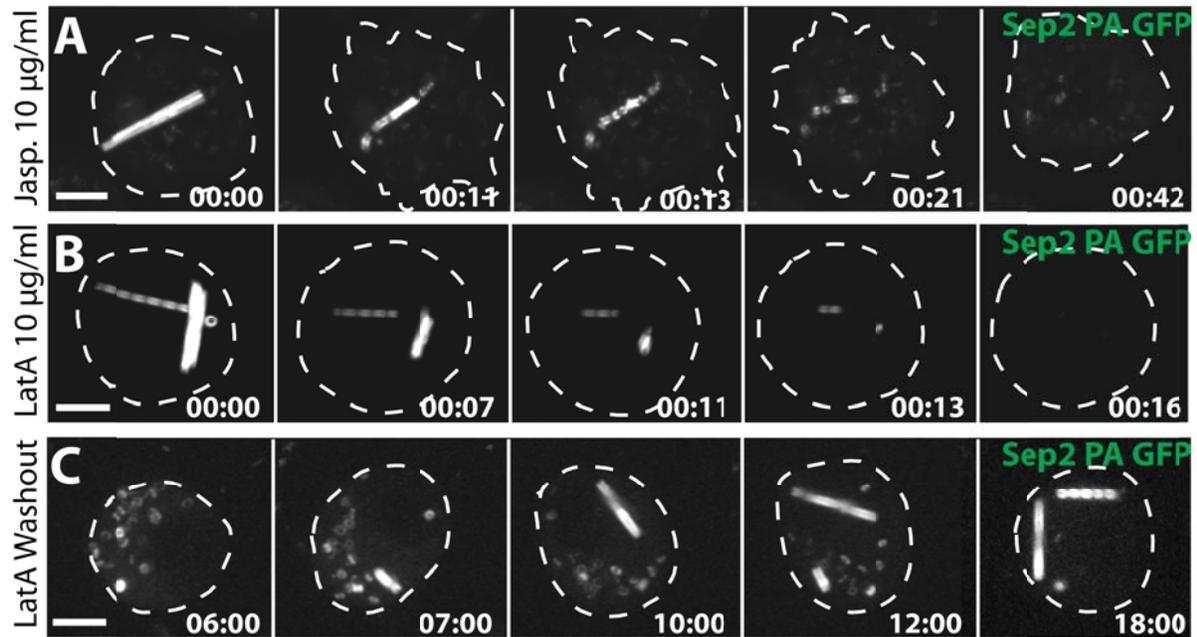
La stabilisation de l'actine avec la Jasplakinolide (10 µg/ml) a déstabilisé les tubes de septines, qui se sont défaits rapidement (16 min) en morceaux, se désassemblant ensuite en ce qui ressemblait à des anneaux. Lors de ce désassemblage, les tubes de Sep2-GFP se sont cassés à plusieurs endroits, en commençant des extrémités vers le milieu du tube comme illustré à la Figure 20, A. On peut s'imaginer que le cytosquelette d'actine, très rigide exerce une force sur ces tubes qui étirés, se brisent et se désassemblent en anneaux. Suite au traitement, ces anneaux persistaient dans le cytoplasme, contrairement à ce qu'on observe suite au traitement avec les ARNi contre Pnut et Sep1.

### **4.7.2 La Latrunculin A**

Suite au traitement avec la Latrunculin A (LatA), les tubes de septines se désassemblent rapidement (42 min), des extrémités vers le centre comme illustré à la figure 20, B. Certaines structures prennent plus de temps que d'autres et peuvent persister même une heure après traitement. Ceci peut être dû à la variation dans la distribution de la drogue lors de son ajout. Ce traitement n'a pas d'effet sur les anneaux de septines, qui restent intacts dans le cytoplasme (difficile à voir à cause du contraste). L'effet de la drogue est réversible après lavage. On observe les tubes de septines, qui se reforment, 6 heures après lavage, en se rallongeant aux extrémités. Elles atteignent des tailles similaires aux tubes observés en conditions normales comme illustré à

la Figure 20, C. Ce processus prend du temps à commencer (6 heures) et dure plusieurs heures (12 heures). Ces temps sont encore une fois variables selon la structure en question.

On peut alors conclure qu'un cytosquelette d'actine dynamique, où la balance entre La F-actine et la G-actine est bien contrôlée, est essentiel pour le maintien des tubes, mais pas pour le maintien des anneaux de septines. La perturbation de cette balance avec la LatA ou la Jasp mène à leur déstabilisation rapide.



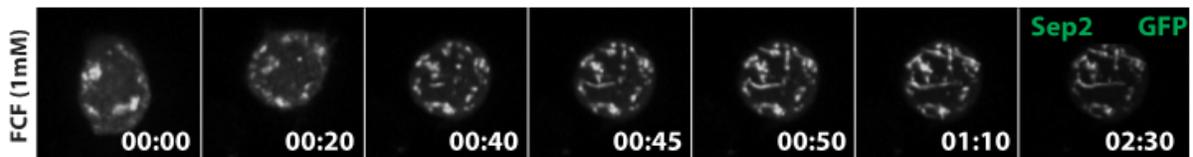
**Figure 20. Les tubes de septines requièrent un cytosquelette d'actine intact**

Cellules S2 exprimant Sep2-GFP, traitées avec de la (A) Jasplakinolide à une concentration finale de 10 µg/ml (B) Latrunculin A à une concentration finale de 10 µg/ml (C) Latrunculin A à

une concentration finale de 10  $\mu\text{g/ml}$  pour 30 min, le milieu a été remplacé par du milieu frais après les 30 min; objectif 63X, échelle 5  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$ .

## 4.8 Le traitement avec le forchlorfenuron induit la formation de structures anormales de septines

Le forchlorfenuron (FCF) a été démontré à stabiliser les structures de septines chez la levure et les mammifères <sup>49</sup>. Nous avons voulu étudier son effet sur les tubes de septines, observées chez la *Drosophile*. Plusieurs concentrations de FCF ont été testées et un effet a été observé seulement à des concentrations très hautes (1 mM). Des filaments courbés se forment en grand nombre au cortex cellulaire, qui fige suite au traitement. Cette dose est même toxique pour certaines cellules. Alors on peut conclure que cette drogue a un effet sur les septines dans des cellules S2 de *Drosophile*, seulement à des concentrations très hautes et que les structures induites sont anormales et ne ressemblent pas aux tubes observés en temps normal.



**Figure 21 FCF induit la formation des structures anormales de septines**

Cellules exprimant Sep2-GFP traitées avec du FCF (1 mM), la drogue a été rajoutée à 4 min; objectif 63X, 1.4NA.

## **4.9 Les sondes de F-actine ne se localisent pas aux tubes et aux anneaux de septines**

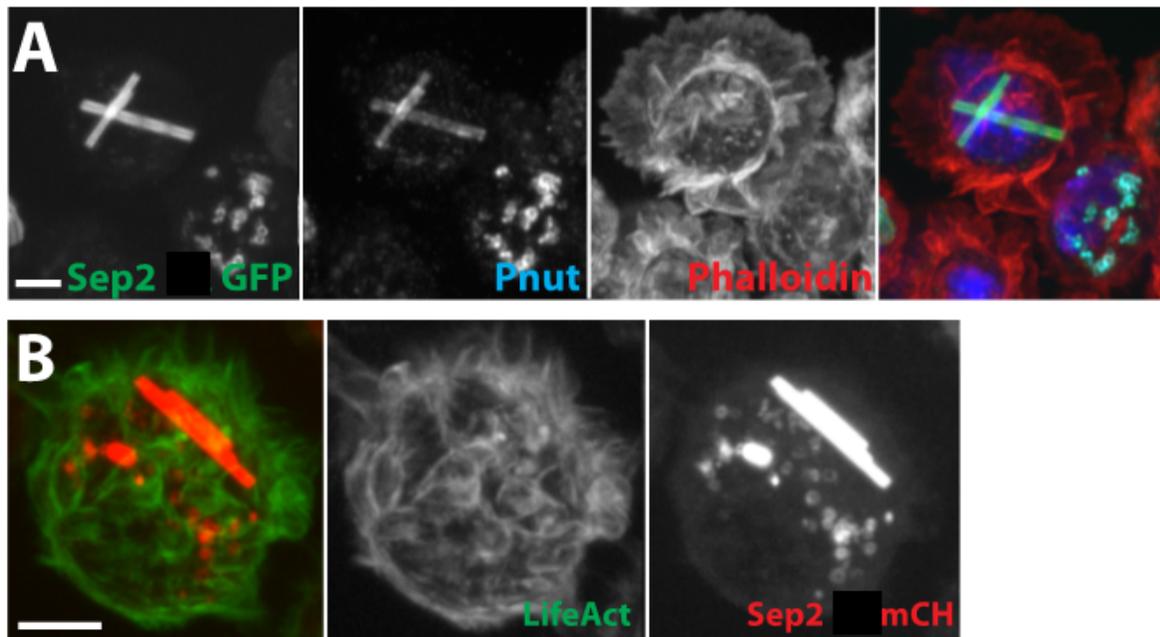
Sachant que les tubes de septines requièrent un cytosquelette d'actine fonctionnel, on s'est demandé si l'actine interagit directement avec les septines et donc se localiserait aux tubes de septines. Pour répondre à cette question, on a utilisé des sondes de F-actine fréquemment utilisées : la phalloïdine et le LifeAct.

### **4.9.1 La phalloïdine**

La phalloïdine marque les filaments d'actine avec une grande affinité et est traditionnellement utilisée comme marqueur de la F-actine en immunofluorescence. Suite à un marquage à la phalloïdine, et un marquage avec un anticorps contre Pnut, on n'observe pas de colocalisation entre les tubes de septines et la F-actine. Il n'y a pas de diminution ni d'augmentation du signal de la phalloïdine au niveau des tubes de septines.

### **4.9.2 LifeAct**

Pour vérifier et appuyer ce qu'on a observé avec la phalloïdine, on a eu recours à une autre méthode de marquage. Le lifeAct est une sonde qui lie les filaments d'actine sans interférer avec leur capacité à polymériser. Cette sonde couplée au GFP a été co-exprimée avec Sep2-mCH dans des cellules S2. Encore une fois aucune colocalisation n'a été observée. Le signal de la sonde LifeAct n'augmente pas ni ne diminue au niveau des tubes de septines, tel qu'illustré à la Figure 22.



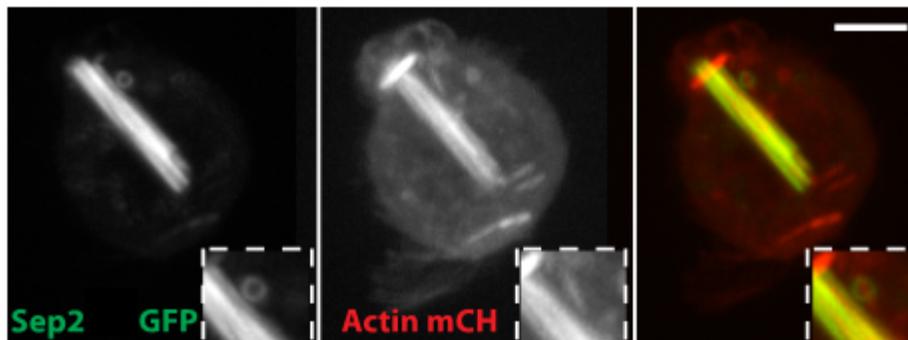
**Figure 22. Les sondes de F-actine ne reconnaissent pas les tubes ni les anneaux de septines**

(A) Cellules S2 exprimant Sep2-GFP fixées au formaldéhyde et marquées avec de la phalloïdine, de l'hoechst et un anticorps contre Pnut (cyan) (B) Cellules S2 vivantes exprimantes LifeAct-GFP (vert) et Sep2-mCH; objectif 63X, 1.5NA, échelle 5µm.

Alors on peut conclure que la F-actine reconnue par la phalloïdine et le LifeAct ne se localise pas aux tubes de septines. On ne peut pas, toutefois, exclure la possibilité que la G-actine et même possiblement de la F-actin, non reconnue par la phalloïdine ou le LifeAct, pourrait quand même se localiser aux tubes de septines.

## 4.10 L'Actin05C-mCH se localise aux tubes, mais pas aux anneaux

En sachant que la F-actine, reconnue par la phalloïdine et le LifeAct, ne se localise pas aux tubes de septines, deux possibilités s'offrent à nous : une interaction (directe ou indirecte) avec l'actine-G (indépendamment de la polymérisation), ou une interaction (directe ou indirecte) avec la F-actine non reconnue par la phalloïdine/le LifeAct. Une interaction uniquement avec la G-actine, pourrait être expliquée par un changement de conformation lors de la polymérisation de l'actine, qui empêcherait l'accès à la poche de liaison des septines. Pour tester cette possibilité, on a voulu observer si la G-actine se localise aux tubes et aux anneaux de septines. Pour ce faire nous avons fait une lignée cellulaire co-exprimant l'Actin05C cytoplasmique, couplée au mCherry et Sep2-GFP. Nous observons alors une forte colocalisation entre ces deux protéines spécifiquement aux tubes de septines, mais pas aux anneaux. Ceci, et le fait que la LatA et la Jasp ne perturbent pas les anneaux de septines, suggèrent que la formation des anneaux est indépendante de l'actine, mais que leur polymérisation en tubes nécessite un cytosquelette d'actine dynamique. L'hypothèse que les septines interagissent seulement avec la G-actine est donc toujours valide. Nous avons voulu étudier cette proposition plus en profondeur.



**Figure 23. L'Actin05C colocalise avec Sep2 aux tubes de septines, mais pas aux anneaux**

Cellules S2 exprimant Actin05C-mCH et Sep2-GFP montrant la colocalisation entre ces deux protéines aux tubes de septines, mais pas aux anneaux; objectif 63X, 1.5 NA, échelle 5 $\mu$ m.

## **4.11 La capacité de l'actine à polymériser est essentielle pour sa localisation aux tubes de septines**

Vu qu'on observe la colocalisation de l'Actin05C et de Sep2-GFP seulement en marquant directement l'actine et que cette colocalisation est absente avec les sondes de F-actine, on a pensé que l'actine sous forme filamenteuse ou globulaire semble inaccessible aux marqueurs d'actine. La polymérisation de l'actine pourrait empêcher son interaction avec les septines en bloquant le site de liaison de celles-ci. La forme non polymérisée de l'actine (G-actine) serait la seule forme capable d'interagir avec les septines.

### **4.11.1 Le mutant Actin05C R62D**

Pour tester l'hypothèse que l'actine sous forme filamenteuse ou globulaire est inaccessible aux marqueurs d'actine nous avons décidé de construire un mutant de l'actine dépourvu de son habilité à polymériser et former des filaments d'actine. Pour ce faire on a introduit une mutation (R62D). Ce mutant est connu comme le mutant de charge inversée et présente des défauts dans un pont de sel entre les sous-domaines deux et quatre de l'actine, ce qui affecte la poche de liaison du nucléotide et perturbe les changements conformationnels nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP <sup>8</sup>.

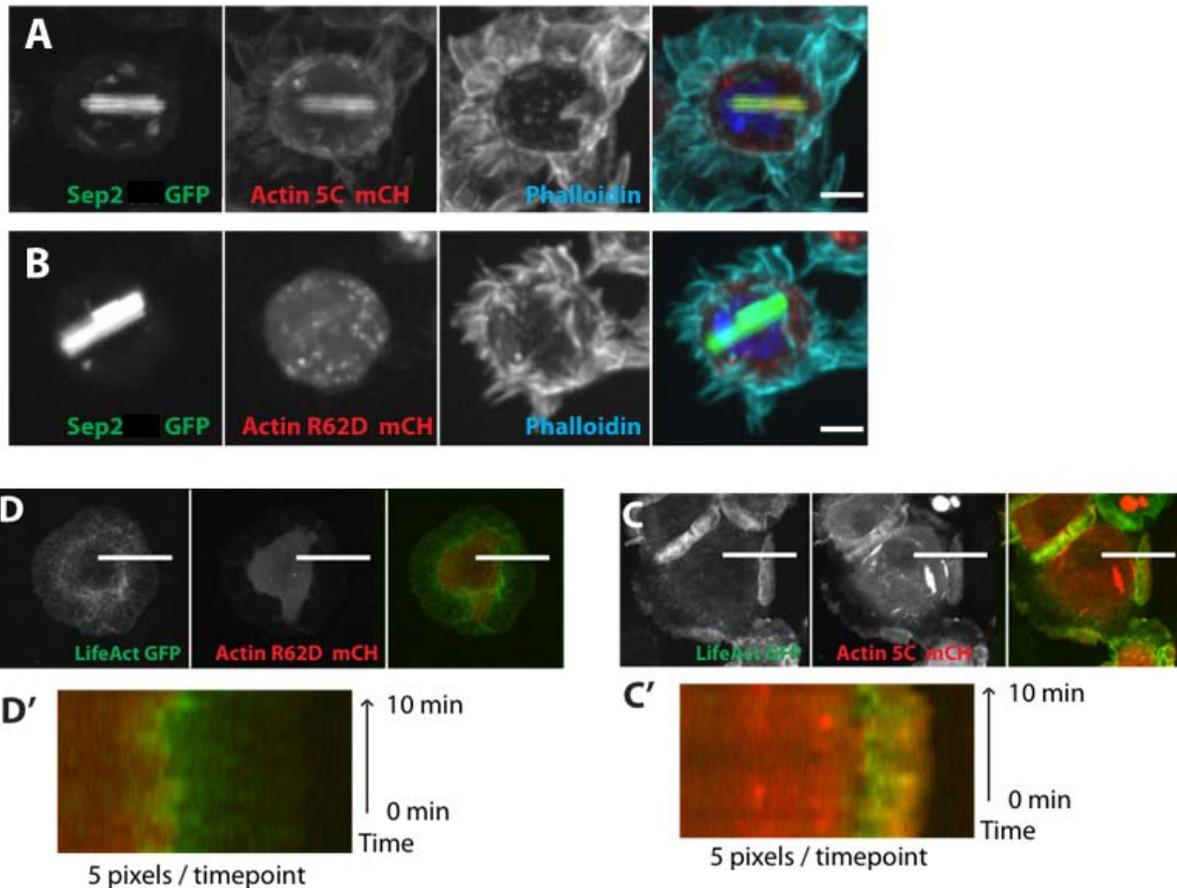
### **4.11.2 Le mutant Actin05C R62D se localise mal aux lamellipodes riches en actine**

Pour vérifier que ce mutant est bien dépourvu de sa capacité à polymériser, on a comparé sa capacité d'être intégré aux lamellipodes riches en actine comparativement à l'Actin05C sauvage. Des kymographes ont été générés pour le mutant et l'actine sauvage, co-exprimée avec LifeAct-GFP. Ces kymographes nous permettent de mieux visualiser la localisation de ces deux protéines sur une période de 10 min. Le kymographe montre bien la colocalisation de LifeAct et

de l'Actin05C dans les lamellipodes riches en actine, tel qu'illustré à la Figure 24, C' en jaune, tandis que le signal pour le mutant se retrouve surtout dans le cytoplasme et ne colocalise pas avec LifeAct. L'actine est hautement conservée d'un organisme à un autre et le mutant d'Actin05C R62D n'est pas capable de polymériser et s'intégrer dans les lamellipodes riches en actine chez la *Drosophile*.

### 4.11.3 Le mutant Actin05C R62D se localise mal aux tubes de septines

Le mutant se localise très mal aux tubes de septines, alors la capacité de l'actine à former des filaments est importante pour la colocalisation de ces deux protéines dans les tubes.

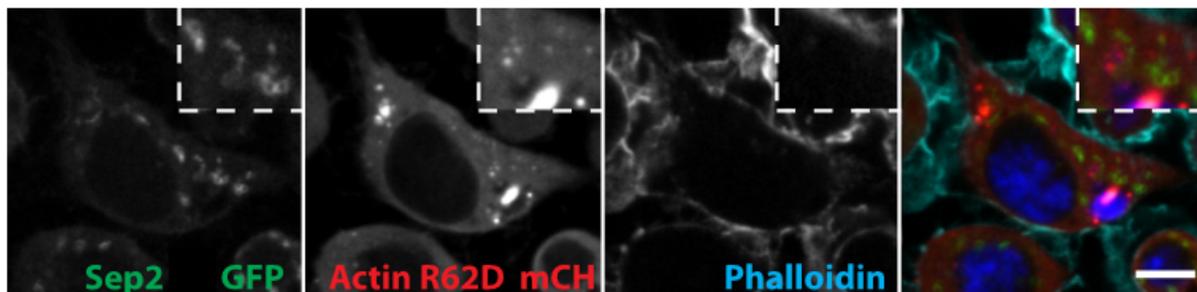


## Figure 24. La capacité de l'actine à se polymériser est essentielle pour sa localisation aux tubes de septines

(A) Cellules S2 exprimant Actin05C-mCH et Sep2-GFP (vert) fixées au formaldéhyde et marquées avec de l'hoechst et de la phalloïdine (cyan) (B) Cellules S2 exprimant Actin05C R62D-mCH et Sep2-GFP (vert) fixées au formaldéhyde et marquées avec de l'hoechst et de la phalloïdine (cyan) (C) Cellules S2 exprimant Actin05C-mCH et LifeAct (vert) (C') Kymograph de (C) (D) Cellules S2 exprimant Actin05C R62D-mCH et LifeAct (vert) (D') Kymograph de (D).

### 4.11.4 Le mutant Actin05C R62D forme des punctas

Le mutant Actin05C R62D forme des punctas dans le cytoplasme de la cellule. Ces punctas sont désorganisés et ne colocalisent pas dans les anneaux de septines.

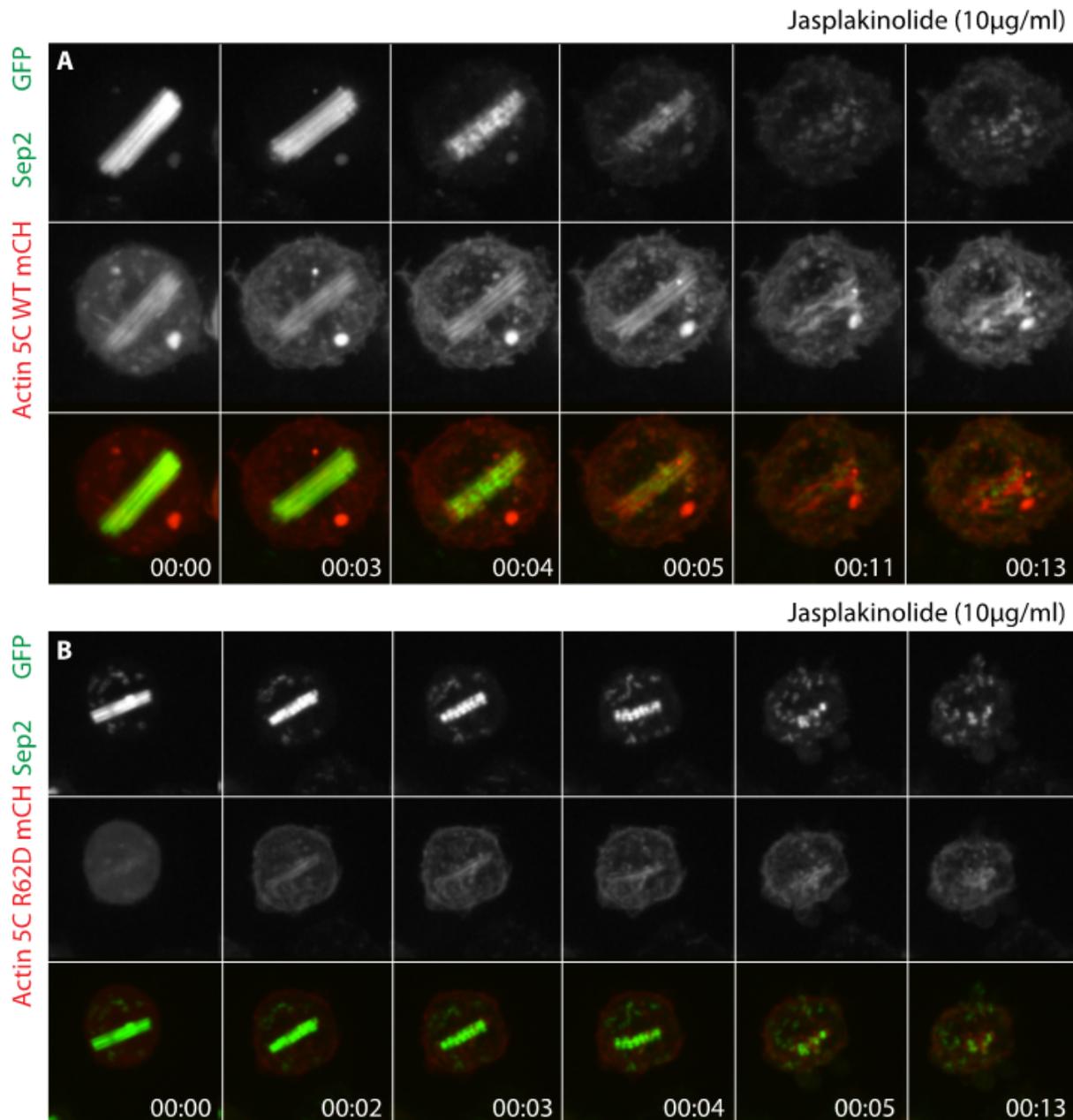


## Figure 25. Le mutant forme des punctas qui sont différents des anneaux de septines observés

Cellules S2 exprimant Sep2-GFP et Actin05C R62D-mCH fixées au formaldéhyde et marquées avec de la phalloïdine (cyan) et de l'hoechst; objectif 63X, 1.5NA, échelle 5  $\mu$ m.

## **4.12 La stabilisation de l'actine avec la Jasplakinolide induit une perte précoce de Sep2 des tubes**

On connaît déjà l'effet déstabilisant du traitement avec la Jasplakinolide sur les tubes de septines, alors on s'est intéressé à ce qui se passe avec l'actine dans ces tubes. Pour mieux comprendre l'implication de l'actine dans les tubes de septines, nous avons traité la lignée cellulaire co-exprimant l'Actin05C et Sep2-GFP avec la Jasplakinolide. Suite au traitement, on observe un effet immédiat sur les septines qui se désassemblent rapidement (13 min) en anneaux. Le cytosquelette d'actine reste dans les structures, mais semble beaucoup plus désorganisé en absence des septines, tel qu'illustré à la Figure 26. Cette même expérience a été répétée pour le mutant Actin05C R62D. Le même phénotype a été observé, dans la même fenêtre de temps, tel que démontré par la Figure 26. On peut alors penser que l'actine orchestre l'assemblage des tubes de septines et que la quantité d'actine nécessaire est petite et suffisante dans le cas du mutant Actin05C R62D qui se localise très faiblement aux tubes de septines. Il semble aussi que les septines sont importantes pour la propre organisation des filaments d'actine qui se déforment suite au désassemblage des septines.



**Figure 26. Sep2-GFP se localise aux tubes et pars en premier après le traitement avec la Jasplakinolide**

(A) Cellules S2 exprimant Sep2-GFP et Actin5C WT-mCH traitées avec la Jasplakinolide (10 µg/ml) (B) Cellules S2 exprimant Sep2-GFP et Actin5C R62D-mCH traitées avec la Jasplakinolide (10 µg/ml).

## **4.13 La déplétion d'AIP1 et de la cofiline mène à la déstabilisation des tubes**

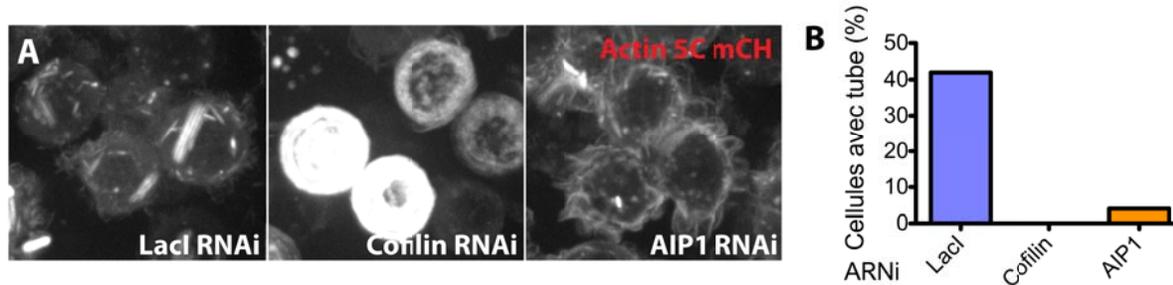
Pour mieux comprendre la relation entre l'actine et les septines dans les anneaux et tubes qu'on observe, on a regardé l'effet de la déplétion de différents régulateurs, médiateurs et inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (cappucino, profiline, daam, cofiline, spire, arp 2/3, AIP1). Seule la déplétion par ARNi de la cofiline et de l'AIP1 a eu un effet sur les tubes de septines.

### **4.13.1 La cofiline**

La cofiline est une protéine qui déstabilise les filaments d'actine. Quelques molécules de cofiline sont nécessaires pour couper un filament d'actine, qui déstabilisé, se désassemble d'avantage. Ceci permet un réarrangement du cytosquelette rapide en réponse des signaux externes. La déplétion de cette protéine par ARNi, déstabilise aussi les tubes de septines qui se désassemblent en anneaux dans le cytoplasme, le même phénotype observé suite au traitement avec la Latrunculin A et la Jaspakolinolide.

### **4.13.2 L'AIP1**

L'AIP1 est une protéine qui se lie à l'extrémité dynamique de l'actine et empêche ainsi l'ajout de monomères d'actine. Ceci empêche le rallongement du filament qui est alors déstabilisé et se désassemble en monomères dans le cytoplasme. Ceci est un moyen pour la cellule de restructurer son cytosquelette selon ses besoins immédiats. La déplétion de cette protéine mène au même phénotype observé avec le traitement avec la LatA et la Jasp, ainsi que la déplétion de la cofiline. La déplétion de l'AIP1 et la déplétion de la cofiline aboutissent en fin compte à la stabilisation de la F-actine et rendent le cytosquelette d'actine moins dynamique.

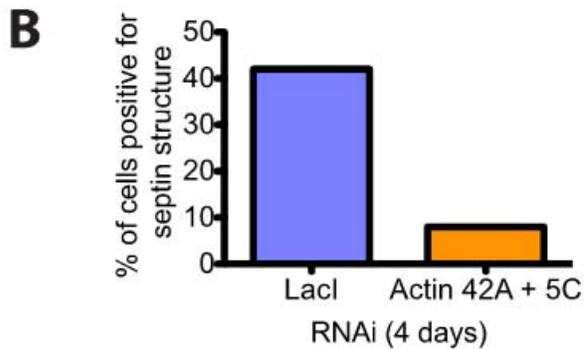
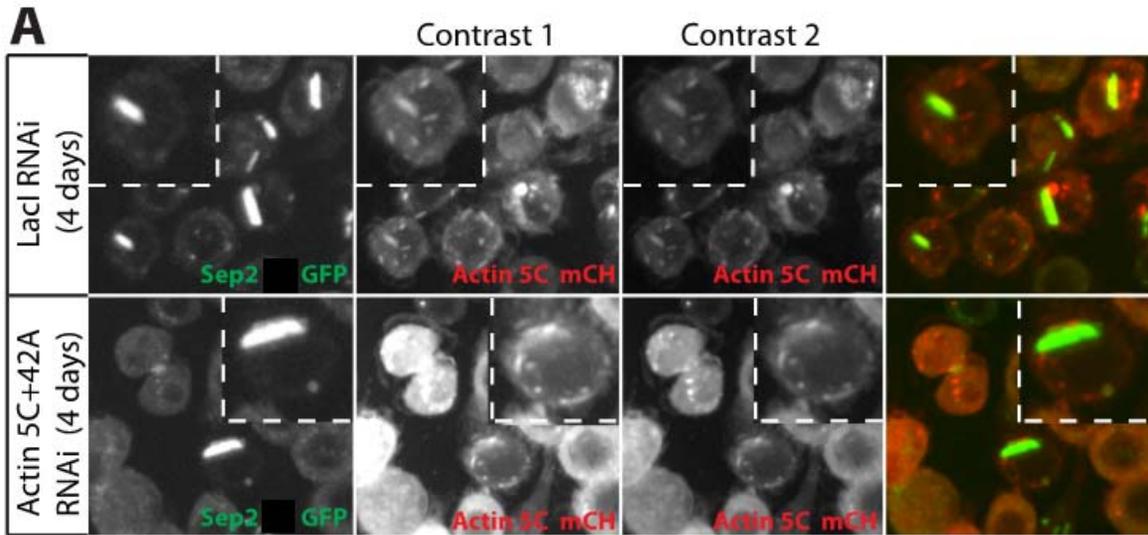


## Figure 27. La déplétion de Cofilin/AIP1 déstabilise les tubes de septines

(A) Cellules S2 exprimant Actin5C-mCH traitées avec des ARNi contre LacI (contrôle), cofiline et AIP1 pour 4 jours (B) Quantification des cellules avec tube de septine suite au traitement avec des ARNi contre LacI (contrôle), cofiline et AIP1 pour 4 jours.

## 4.14 L'actine marquée avec mCH s'intègre moins bien dans les structures de septines

Pour vérifier si l'Actin05C se comporte comme l'actine endogène dans les structures de septines, on a tenté à dépléter l'actine endogène à l'aide des ARNi contre l'Actin05C et l'Actin42A cytoplasmiques. Des cellules coexprimantes Sep2-GFP et Actin05C-mCH ont été traitées avec de l'ARNi contre LacI (contrôle) ou contre l'Actin05C 3'UTR et l'Actin42A 3'UTR pour 4 jours. Suite à ce traitement, on observe la diminution du nombre de tubes de septines présentes. Le pourcentage de cellules positives pour un tube de septines a été quantifié et il passe d'environ 40% à 10%. De plus l'expression de l'Actine-mCH exogène qui est sous contrôle du promoteur *actin05C* augmente. L'intensité du signal Actin05C mCH augmente amplement suite au traitement avec ARNi contre l'Actin05C 3'UTR et l'Actin42A 3'UTR (images comparables traitées identiquement). On peut alors penser que l'actine marquée avec mCH s'intègre moins bien dans les structures de septines.



**Figure 28. La déplétion de l'actine endogène déstabilise les tubes de septines et augmente l'expression de l'Actine-mCH exogène qui est sous contrôle du promoteur *actin05C***

(A) Des images traitées d'une manière identique de Cellules S2 de *Drosophile* exprimant Sep2-GFP et Actin05C-mCH traitées avec de l'ARNi contre LacI (contrôle) ou Actin05C 3'UTR et Actin42A 3'UTR pour 4 jours (B) Quantification du pourcentage de cellules positives pour un tube de septines suite au traitement avec des l'ARNi contre LacI (contrôle) ou Actin05C 3'UTR et Actin42A 3'UTR pour 4 jours.

## 5. Discussion

### 5.1 Les septines forment des tubes et des anneaux hautement organisés dans les cellules S2 de *Drosophila*

Les septines s'organisent en anneaux et tubes dans les cellules S2 de *Drosophila*. Nous avons pu observer ces tubes de deux manières différentes : avec un anticorps (contre Pnut) en immunofluorescence et en les marquant avec une protéine fluorescente (Sep2-GFP) *in vivo*. Ces structures sont présentes dans des cellules S2 non transfectées, et disparaissent suite à la déplétion spécifique de la septine Pnut, tel qu'illustré à la Figure 10, ce qui exclue la possibilité qu'elles soient des artéfacts de marquage. Des anneaux et des filaments de septines ont été décrits dans d'autres organismes comme les mammifères et la levure bourgeonnante<sup>27,82</sup>, mais les structures qu'on observe sont uniques à cause de leur taille (2-15  $\mu\text{m}$ ), de leur structure (tubes et anneaux) et de leur localisation cytoplasmique dans la cellule. Étant donné que les anneaux sont présents dans 100% des cellules et tandis que les tubes peuvent être détectés que dans 30% des cellules, on peut penser que les anneaux sont la forme de stockage principale des septines et que la formation des tubes est seulement possible dans certaines cellules. Ce qui détermine si une cellule possédera un, plusieurs ou aucun tube de septines n'est pas encore clair. La concentration de septines dans la cellule pourrait être le facteur déterminant ou encore, un signal cellulaire spécifique pourrait induire la formation de ces structures. Un rôle spécifique ne peut pas encore leur être attribué, mais de ce qu'on observe, il serait logique de penser qu'elles seraient tout simplement une forme de stockage utilisée par la cellule. Par contre, on ne peut pas exclure la possibilité qu'elles soient indispensables que pour certaines cellules avec un destin cellulaire précis.

## 5.2 Pnut, Sep1 et Sep2 sont essentiels pour la formation de ces tubes et de ces anneaux

Le complexe **Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut** a été purifié à partir des embryons de *Drosophila* par Christine Field<sup>20</sup>. Ce qu'on observe supporte la présence de ce complexe dans des cellules S2 de *Drosophila*. La déplétion de chaque protéine participante par ARNi mène à la déstabilisation de ce complexe et donc à la déstabilisation des anneaux et des tubes de septines hautement organisés. La littérature supporte l'idée que les septines sont stables uniquement dans un complexe, et que la déstabilisation d'une composante mène à la dégradation des autres<sup>30</sup>. La diminution des niveaux d'expression de Pnut suite à la déplétion de Sep1 par ARNi, concorde avec cette notion, et serait due à la dégradation de cette protéine suite à la déstabilisation de l'hexamère de base. Il est intéressant de constater qu'on obtient un phénotype différent suite à la déplétion de Sep1 par ARNi, ou la déplétion de Pnut et de Sep2 par ARNi. Suite à la déplétion de Sep1, on observe la formation des agrégats de GFP tandis que suite à la déplétion de Sep2 et de Pnut, on observe la dispersion uniforme du signal GFP à travers la cellule. Ceci peut être expliqué par le fait que l'ARNi contre Sep1 cible sa région 3'UTR et déplete uniquement la protéine endogène, tandis que les ARNi contre Pnut et Sep2 reconnaissent une région présente autant dans la protéine endogène que dans la protéine marquée au GFP, et déplètent les deux. Il s'en suit que la protéine marquée toute seule n'est pas capable de former des tubes et anneaux de septines, mais s'organise plutôt en agrégats désorganisés. Le marqueur fluorescent à l'extrémité N terminale ou à l'extrémité C terminale interfère avec les interactions entre les septines, nécessaires pour la formation du complexe **Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut**, probablement en changeant l'interface NC où se lie le GFP ou le mCH.

Il y a de l'évidence dans la littérature qu'il peut y avoir une hétérogénéité dans les complexes de septines formés<sup>30</sup>. Les septines dans chaque groupe seraient interchangeables dans les complexes, ce qui donnerait plusieurs complexes possibles. La formation de ces complexes serait déterminée selon les niveaux d'expression des différentes septines dans les tissus. Ceci peut expliquer le fait qu'on observe la localisation de Sep5-GFP dans des structures similaires à celles observées avec Sep2-GFP. Ce gène est un rétrogène de Sep2, et les deux exercent des

fonctions redondantes <sup>80</sup>. Sep5 pourrait potentiellement remplacer Sep2 dans le complexe, pour donner un nouveau complexe : **Pnut-Sep5-Sep1-Sep1-Sep5-Pnut**.

### **5.3 Les tubes de septines ne sont pas nécessaires pour la cytokinèse**

Les tubes de septines ne sont pas régulés ni essentiels pour la cytokinèse, malgré la localisation des septines au sillon d'ingression. Les tubes persistent pendant la cytokinèse, tandis que les anneaux disparaissent pour une courte période pendant l'anaphase. Cette observation supporte notre hypothèse que les tubes sont une forme de stockage des septines, utilisée par la cellule. La réorganisation des anneaux serait suffisante pour subvenir au besoin de recrutement de septines au sillon de clivage. On sait qu'une petite quantité de septines est suffisante pour compléter la cytokinèse, car il faut dépléter l'expression de Pnut à des niveaux très bas pour observer des cellules binucléées <sup>83</sup>. Ceci explique le fait qu'une incubation de 4 jours avec ARNi contre les différentes septines est suffisante pour induire un phénotype, comparativement à 7 jours d'incubation avec ARNi contre Pnut pour observer des cellules binucléées.

### **5.4 Les tubes de septines sont stables**

Les expériences de FRAP montrent que les structures de septines sont très stables et qu'elles présentent des échanges très lents avec le cytoplasme, car le signal GFP revient, mais très lentement. Ces échanges sont au niveau du complexe de base, car le signal revient uniformément à travers la région irradiée, plutôt qu'en vagues des deux extrémités, ce qui indiquerait des échanges plutôt au niveau des anneaux. On ne peut pas être certain que ces échanges sont équivalents autant aux extrémités qu'au milieu d'un tube. Le taux de retour des septines est bas. Ceci peut être expliqué par le fait qu'elles forment des complexes symétriques non polaires et présentent une hydrolyse du GTP en GDP très lente. Par contre, on peut penser

que comme pour l'actine et les microtubules, des régulateurs de septines pourraient accélérer ou ralentir ces échanges. Malheureusement, de tels régulateurs n'ont pas encore été identifiés.

## **5.5 La Latrunculine A, le Cytochalasin D et la Jasplakinolide déstabilisent le cytosquelette de septines**

La perturbation du cytosquelette d'actine avec des drogues déstabilisantes, ou des drogues stabilisantes, mène toujours à la déstabilisation des tubes de septines. On peut alors penser qu'un cytosquelette d'actine intact et dynamique est nécessaire pour le maintien des tubes de septines. Des mécanismes d'assemblage, utilisant le cytosquelette d'actine comme étalon, ont été proposés pour les septines<sup>84</sup>. Les tubes, mais pas les anneaux de septine, nécessiteraient alors un cytosquelette d'actine bien balancé. Le traitement avec la Latrunculine A séquestre les monomères d'actine, ce qui déstabilise les filaments d'actine et induit leur dépolymérisation rapide. Les tubes de septines se désassemblent alors des deux extrémités très rapidement. La Jasplakinolide stabilise les filaments d'actine en facilitant la nucléation ce qui rend la cellule très rigide et encore une fois, mène à la dépolymérisation des tubes de septines. Elles se cassent à plusieurs places au long du tube, probablement à cause d'une tension cellulaire augmentée. Ces deux mécanismes différents perturbent la balance entre la F-actine et la G-actine en modifiant la concentration d'actine critique. Cette balance est alors primordiale pour le maintien des tubes de septines. Il est important de noter que l'effet des deux drogues est très rapide, contrairement à ce qu'on observe suite au FRAP. La réorganisation du cytosquelette d'actine, ou l'activation de certains régulateurs de cette interaction serait donc un moyen rapide pour la cellule à mobiliser les septines suite à un besoin créé par un signal externe.

## **5.6 La déplétion de l'AIP1 et de la cofiline déstabilise le cytosquelette de septines**

La déplétion de l'AIP1 ou de la cofiline induit la dépolymérisation des tubes de septines. En déplétant ces protéines, on empêche la coupure des filaments d'actine, ce qui les stabilise. Cet effet est semblable à l'effet obtenu suite au traitement avec la Jasplakinolide et mène au même phénotype. Aucun autre régulateur d'actine n'a eu d'effet sur les tubes de septines. On peut alors penser qu'un cytosquelette d'actine dynamique serait nécessaire pour permettre l'assemblage des tubes de septines. L'effet de la cofiline et de l'AIP1 semble être indirect, car la cofiline ne se localise pas aux tubes de septines. Par contre, ce mécanisme n'est pas encore entièrement éclairci.

## **5.7 L'actine se localise aux tubes de septines**

Vu qu'on observe un lien entre le cytosquelette d'actine et les tubes de septines on s'est intéressé à savoir si ce lien est direct ou indirect. On cherchait à identifier une colocalisation entre l'actine et les tubes de septines à l'aide des sondes de F-actine traditionnelles. La phalloïdine et le LifeAct ne se localisent pas aux tubes de septines. Il est intéressant à noter que la Jasplakinolide et la phalloïdine partagent le même site de liaison, et que les deux stabilisent l'actine dans sa forme polymérisée<sup>42,47</sup>. On peut alors se douter que la liaison de la phalloïdine à l'actine pourrait aussi déstabiliser les tubes de septines. Par contre, ceci n'explique pas pourquoi le LifeAct ne se localise pas aux tubes de septines. On a alors considéré la possibilité que la G-actine soit la seule forme qui pourrait interagir avec les septines. Pour tester cette hypothèse on a co-exprimé l'Actin05C-mCH cytoplasmique avec Sep2-GFP. Les deux protéines colocalisent très clairement dans les tubes de septines mais pas dans les anneaux, tel que démontré par la Figure 23. Par contre, aucune interaction directe entre l'actine et les septines n'a encore été détectée dans la littérature.

## **5.8 La capacité de polymérisation de l'actine est essentielle pour sa localisation aux tubes de septines**

Le mutant R62D non polymérisable de l'Actin05C perd sa capacité à se localiser aux tubes de septines. Cette mutation induit des changements conformationnels qui empêchent sa polymérisation en filaments. Le mutant ne se localise plus dans les lamellipodes riches en actine avec la F-actine, tel que démontré par la Figure 24. Les structures de septines restent intactes ce qui indique que l'actine endogène est suffisante pour leur maintien. On sait que la déplétion de l'actine endogène cause le désassemblage des tubes en anneaux. Le pont de sel entre les domaines 2 et 4 de l'actine est alors important pour l'interaction entre l'actine et les septines dans les tubes de septines.

## **5.9 L'actine endogène est nécessaire pour le maintien des structures de septines**

Comme mentionné plus haut, la déplétion de l'actine endogène déstabilise les tubes de septines et mène à leur désassemblage en anneaux. L'Actine-mCH n'est pas entièrement fonctionnelle. Le marqueur fluorescent perturbe son intégration dans les tubes de septines. Suite à la déplétion de l'actine endogène avec des ARNi ciblant la région 3'UTR, le pourcentage de cellules avec un tube de septines passe de 40% à seulement 10%. L'Actine-mCH est moins bien intégrée dans les tubes de septines. Son extrémité N-terminale est donc impliquée dans l'interaction avec les septines au niveau des tubes observés. On devrait aussi regarder les niveaux d'expression de l'actine dans ces cellules, avant et après le traitement avec des ARNi contre l'actine cytoplasmique.

## **5.10 Futures expériences et perspectives**

Les futures études ont comme but de mieux comprendre comment les septines sont connectées au cytosquelette d'actine et serviraient à élaborer le mécanisme d'interaction entre les

deux. On veut aussi mieux comprendre comment ces protéines s'organisent dans des structures hautement organisées et ce qui détermine les complexes de base formés.

Étant donné, que la déplétion de la cofiline et de l'AIP1 déstabilise les tubes de septines, il serait intéressant d'explorer si ces protéines se localisent aux tubes et interagissent directement avec les septines. Ceci peut être vérifié, soit en construisant une lignée cellulaire co-exprimant Sep2-GFP et Cofiline-mCH ou AIP1-mCH, soit en faisant un marquage avec des anticorps contre la cofiline ou contre l'AIP1 sur la lignée exprimant Sep2-GFP.

Vu que le traitement avec Latrunculin A déstabilise les tubes de Septines, on peut aussi explorer d'autres drogues qui perturbent le cytosquelette d'actine par un mécanisme différent comme le Cytochalasin D. Selon l'effet de cette drogue sur les tubes de septines, on pourrait potentiellement extraire de l'information supplémentaire sur le mécanisme par lequel la Latrunculin A entraîne le désassemblage des tubes en anneaux.

Des expériences d'immunoprecipitation pourraient aussi être utiles pour voir si l'actine et certaines septines interagissent physiquement.

Il serait aussi intéressant de regarder si d'autres cellules de *Drosophila* présentent des structures de septines similaires. De simples marquages avec un anticorps contre Pnut seraient suffisants pour tester cette possibilité. Des cellules de *Drosophila* S2C, S2R+, S3, DL1, DL2 seraient des cibles potentielles. Ces cellules peuvent présenter des structures de septines identiques aux tubes, ou même des structures de septines différemment organisées. Ces structures pourraient utiliser le même complexe de base ou un autre. Toutes ces informations pourront compléter nos connaissances sur les septines.

# Conclusion

En conclusion, nous proposons un système cellulaire pour l'étude des septines et leur organisation dans des structures hautement organisées. Nous démontrons qu'elles forment des tubes et des anneaux cytoplasmiques indépendants du cycle cellulaire. Ces structures nécessitent Sep1, Sep2 et Pnut et sont extrêmement stables. Les tubes de septines colocalisent avec l'Actin05C et nécessitent un cytosquelette d'actine dynamique et balancé. La capacité de polymérisation de l'actine est essentielle pour son interaction avec les septines. La déplétion de la cofiline et de l'AIP1, des régulateurs de la polymérisation de l'actine, déstabilise les tubes de septines. Ces tubes nécessitent l'interaction entre les septines par leurs interfaces NC et G et l'insertion d'un marqueur fluorescent perturbe cette interaction.

Cette étude apporte des informations intéressantes sur l'assemblage des septines en structures hautement organisées et sur l'importance du cytosquelette d'actine pour ces structures. On peut alors proposer un modèle où les septines s'assemblent en utilisant le cytosquelette d'actine en tant qu'étalon. Le contraire a aussi été proposé dans la littérature<sup>34</sup> et reste à être testé dans notre système. Les informations acquises contribuent à la compréhension du fonctionnement et des interactions des septines avec d'autres protéines comme l'actine. Ceci peut être important plus tard pour la compréhension de l'implication des septines dans des maladies, comme le cancer et les maladies neurodégénératives.

# Bibliographie

- 1 Marttinen, M., Kurkinen, K. M., Soininen, H., Haapasalo, A. & Hiltunen, M. Synaptic dysfunction and septin protein family members in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* **10**, 16, doi:10.1186/s13024-015-0013-z (2015).
- 2 Korn, E. D., Carlier, M. F. & Pantaloni, D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* **238**, 638-644 (1987).
- 3 Lodish, H. F. *Molecular cell biology*. 7th edn, (W.H. Freeman and Co., 2013).
- 4 Hardin, J., Bertoni, G., Kleinsmith, L. J. & Becker, W. M. *Becker's world of the cell*. 8th edn, (Benjamin Cummings, 2012).
- 5 Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 183-194, doi:10.1038/nrm3284 (2012).
- 6 Herrmann, H. & Strelkov, S. V. History and phylogeny of intermediate filaments: now in insects. *BMC Biol* **9**, 16, doi:10.1186/1741-7007-9-16 (2011).
- 7 Dominguez, R. & Holmes, K. C. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* **40**, 169-186, doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359 (2011).
- 8 Posern, G., Sotiropoulos, A. & Treisman, R. Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell* **13**, 4167-4178, doi:10.1091/mbc.02-05-0068 (2002).
- 9 Dominguez, R. Structural insights into de novo actin polymerization. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 217-225, doi:10.1016/j.sbi.2009.12.012 (2010).
- 10 Watanabe, N. Inside view of cell locomotion through single-molecule: fast F-/G-actin cycle and G-actin regulation of polymer restoration. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**, 62-83 (2010).
- 11 Campellone, K. G. & Welch, M. D. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 237-251, doi:10.1038/nrm2867 (2010).
- 12 Chaudhry, F. *et al.* Srv2/cyclase-associated protein forms hexameric shurikens that directly catalyze actin filament severing by cofilin. *Mol Biol Cell* **24**, 31-41, doi:10.1091/mbc.E12-08-0589 (2013).
- 13 Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. & Holmes, K. C. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44, doi:10.1038/347037a0 (1990).
- 14 Chik, J. K., Lindberg, U. & Schutt, C. E. The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution. *J Mol Biol* **263**, 607-623, doi:10.1006/jmbi.1996.0602 (1996).
- 15 Haarer, B. K. & Pringle, J. R. 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 (1987).
- 16 Hartwell, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* **69**, 265-276 (1971).
- 17 Bertin, A. *et al.* Three-dimensional ultrastructure of the septin filament network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **23**, 423-432, doi:10.1091/mbc.E11-10-0850 (2012).
- 18 Hall, P. A. & Russell, S. E. The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* **204**, 489-505, doi:10.1002/path.1654 (2004).

- 19 Byers, B. & Goetsch, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* **69**, 717-721 (1976).
- 20 Field, C. M. *et al.* A purified Drosophila septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Biol* **133**, 605-616 (1996).
- 21 Frazier, J. A. *et al.* Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J Cell Biol* **143**, 737-749 (1998).
- 22 Longtine, M. S. *et al.* The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 106-119 (1996).
- 23 De Virgilio, C., DeMarini, D. J. & Pringle, J. R. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology* **142 ( Pt 10)**, 2897-2905, doi:10.1099/13500872-142-10-2897 (1996).
- 24 Kinoshita, M. Diversity of septin scaffolds. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 54-60, doi:10.1016/j.ceb.2005.12.005 (2006).
- 25 McMurray, M. A. & Thorner, J. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div* **4**, 18, doi:10.1186/1747-1028-4-18 (2009).
- 26 Hernandez-Rodriguez, Y. & Momany, M. 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 (2012).
- 27 Sirajuddin, M. *et al.* Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* **449**, 311-315, doi:10.1038/nature06052 (2007).
- 28 Cao, L. *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Lett* **581**, 5526-5532, doi:10.1016/j.febslet.2007.10.032 (2007).
- 29 Pan, F., Malmberg, R. L. & Momany, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* **7**, 103, doi:10.1186/1471-2148-7-103 (2007).
- 30 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, doi:10.1091/mbc.E11-03-0253 (2011).
- 31 Sandrock, K. *et al.* Characterization of human septin interactions. *Biol Chem* **392**, 751-761, doi:10.1515/BC.2011.081 (2011).
- 32 Xie, Y. *et al.* 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 (2007).
- 33 Hickson, G. R. & O'Farrell, P. H. Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. *J Cell Biol* **180**, 285-294, doi:10.1083/jcb.200709005 (2008).
- 34 Mavrakis, M. *et al.* Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat Cell Biol* **16**, 322-334, doi:10.1038/ncb2921 (2014).
- 35 Mendoza, M., Hyman, A. A. & Glotzer, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Curr Biol* **12**, 1858-1863 (2002).
- 36 Huang, Y. W., Surka, M. C., Reynaud, D., Pace-Asciak, C. & Trimble, W. S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS J* **273**, 3248-3260, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05333.x (2006).
- 37 Belas, R., Manos, J. & Suvanasuthi, R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect Immun* **72**, 5159-5167, doi:10.1128/IAI.72.9.5159-5167.2004 (2004).

- 38 Neufeld, T. P. & Rubin, G. M. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* **77**, 371-379 (1994).
- 39 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, doi:10.1016/j.devcel.2007.09.001 (2007).
- 40 Mostowy, S. *et al.* Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe* **8**, 433-444, doi:10.1016/j.chom.2010.10.009 (2010).
- 41 Morton, W. M., Ayscough, K. R. & McLaughlin, P. J. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol* **2**, 376-378, doi:10.1038/35014075 (2000).
- 42 Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B. & Fosen, K. M. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem* **275**, 5163-5170 (2000).
- 43 Dancker, P. & Hess, L. Phalloidin reduces the release of inorganic phosphate during actin polymerization. *Biochim Biophys Acta* **1035**, 197-200 (1990).
- 44 Kinoshita, M. *et al.* Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* **11**, 1535-1547 (1997).
- 45 Xie, H., Surka, M., Howard, J. & Trimble, W. S. 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 (1999).
- 46 Vandekerckhove, J., Deboben, A., Nassal, M. & Wieland, T. The phalloidin binding site of F-actin. *EMBO J* **4**, 2815-2818 (1985).
- 47 Oda, T., Namba, K. & Maeda, Y. Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophys J* **88**, 2727-2736, doi:10.1529/biophysj.104.047753 (2005).
- 48 Riedl, J. *et al.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* **5**, 605-607, doi:10.1038/nmeth.1220 (2008).
- 49 Hu, Q., Nelson, W. J. & Spiliotis, E. T. Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *J Biol Chem* **283**, 29563-29571, doi:10.1074/jbc.M804962200 (2008).
- 50 Lew, D. J. The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 648-653 (2003).
- 51 Joo, E., Tsang, C. W. & Trimble, W. S. Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic* **6**, 626-634, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00305.x (2005).
- 52 Beites, C. L., Xie, H., Bowser, R. & Trimble, W. S. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci* **2**, 434-439, doi:10.1038/8100 (1999).
- 53 Hsu, S. C. *et al.* Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**, 1111-1122 (1998).
- 54 Zhang, J. *et al.* Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol* **9**, 1458-1467 (1999).

- 55 Casamayor, A. & Snyder, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol* **23**, 2762-2777 (2003).
- 56 Mostowy, S. *et al.* Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS One* **4**, e4196, doi:10.1371/journal.pone.0004196 (2009).
- 57 Mostowy, S. *et al.* Septin 11 restricts InlB-mediated invasion by *Listeria*. *J Biol Chem* **284**, 11613-11621, doi:10.1074/jbc.M900231200 (2009).
- 58 Caudron, F. & Barral, Y. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev Cell* **16**, 493-506, doi:10.1016/j.devcel.2009.04.003 (2009).
- 59 Mostowy, S. *et al.* 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 (2011).
- 60 Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S. B., Gonnet, G. & Barral, Y. A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* **454**, 728-734, doi:10.1038/nature07212 (2008).
- 61 Kissel, H. *et al.* The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev Cell* **8**, 353-364, doi:10.1016/j.devcel.2005.01.021 (2005).
- 62 Ihara, M. *et al.* Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell* **8**, 343-352, doi:10.1016/j.devcel.2004.12.005 (2005).
- 63 Chih, B. *et al.* 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 (2012).
- 64 Kim, S. K. *et al.* Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* **329**, 1337-1340, doi:10.1126/science.1191184 (2010).
- 65 Tada, T. *et al.* 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 (2007).
- 66 Cho, S. J. *et al.* 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 (2011).
- 67 Zhu, M. *et al.* 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 (2008).
- 68 Gilad, R. *et al.* High SEPT9\_i1 protein expression is associated with high-grade prostate cancers. *PLoS One* **10**, e0124251, doi:10.1371/journal.pone.0124251 (2015).
- 69 Wasserkort, R. *et al.* Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* **13**, 398, doi:10.1186/1471-2407-13-398 (2013).
- 70 Connolly, D., Abdesselam, I., Verdier-Pinard, P. & Montagna, C. Septin roles in tumorigenesis. *Biol Chem* **392**, 725-738, doi:10.1515/BC.2011.073 (2011).
- 71 So, C. W., Lin, M., Ayton, P. M., Chen, E. H. & Cleary, M. L. Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* **4**, 99-110 (2003).

- 72 Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**, 823-833, doi:10.1038/nrc2253 (2007).
- 73 Kinoshita, A. *et al.* Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **153**, 1551-1560, doi:10.1016/S0002-9440(10)65743-4 (1998).
- 74 Ageta-Ishihara, N. *et al.* 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 (2013).
- 75 Hu, Q. *et al.* 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 (2010).
- 76 Kuo, Y. C. *et al.* SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *J Cell Sci* **128**, 923-934, doi:10.1242/jcs.158998 (2015).
- 77 Cies, J. J., Moore, W. S., 2nd, Chopra, A., Lu, G. & Mason, R. W. Stability of furosemide and chlorothiazide stored in syringes. *Am J Health Syst Pharm* **72**, 2182-2188, doi:10.2146/ajhp150023 (2015).
- 78 Foley, E. & O'Farrell, P. H. Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen. *PLoS Biol* **2**, E203, doi:10.1371/journal.pbio.0020203 (2004).
- 79 Stumpflen-Mausser, I., Hengstschlager, M., Wimmer, M., Zekert, M. & Bettelheim, D. [Prenatal diagnosis of Bourneville-Pringle disease (cerebral tuberous sclerosis)]. *Ultraschall Med* **17**, 34-37, doi:10.1055/s-2007-1000452 (1996).
- 80 O'Neill, R. S. & Clark, D. V. The *Drosophila melanogaster* septin gene *Sep2* has a redundant function with the retrogene *Sep5* in imaginal cell proliferation but is essential for oogenesis. *Genome* **56**, 753-758, doi:10.1139/gen-2013-0210 (2013).
- 81 Sechi, S. *et al.* GOLPH3 is essential for contractile ring formation and Rab11 localization to the cleavage site during cytokinesis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* **10**, e1004305, doi:10.1371/journal.pgen.1004305 (2014).
- 82 Barral, Y. & Kinoshita, M. Structural insights shed light onto septin assemblies and function. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 12-18, doi:10.1016/j.ceb.2007.12.001 (2008).
- 83 Kechad, A., Jananji, S., Ruella, Y. & Hickson, G. R. Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis. *Curr Biol* **22**, 197-203, doi:10.1016/j.cub.2011.11.062 (2012).
- 84 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).